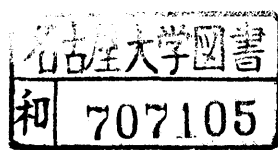


罹病サツマイモのイソプレノイド生合成  
における代謝調節の生化学的研究

鈴木 寛





# 目次

略語表	— — — — —	1
緒論	— — — — —	3
文献	— — — — —	13
第一章	黒斑病菌感染及び $HgCl_2$ 投与による HMG-CoAレダクターゼの活性変動並びに その細胞内局在性	— — — — — 23
緒言	— — — — —	23
実験方法	— — — — —	25
実験結果	— — — — —	31
考察	— — — — —	37
文献	— — — — —	42
第二章	ミクロゾーム結合 HMG-CoAレダクターゼの 活性に及ぼす BSA, 基質及び脂質の 影響	— — — — — 56
緒言	— — — — —	56
実験方法	— — — — —	58
実験結果	— — — — —	61
考察	— — — — —	67

文献	----- 71
----	----------

第三章	ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼの 可溶化, 部分精製並びにその酵素学 的性質	----- 85
-----	--	----------

緒言	----- 85
----	----------

実験方法	----- 88
------	----------

実験結果	----- 92
------	----------

考察	----- 97
----	----------

文献	----- 102
----	-----------

要約	----- 121
----	-----------

謝辞	----- 131
----	-----------

## 略語表

Ip	ipomeamarone
AcCoA	acetyl CoA
MVA	mevalonate
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA
AcAcCoA	acetoacetyl CoA
PP	pyrophosphate
Mt	mitochondria (or mitochondrial)
Ms	microsomes (or microsomal)
G-6-P	glucose 6-phosphate
G-6-PDH	glucose 6-phosphate dehydrogenase
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
cyt.	cytochrome
BSA	bovine serum albumin
FFA	free fatty acid
EDC	1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
HMG	3-hydroxy-3-methylglutaric(acid)
HLB	hydrophilic lipophilic balance

PC	phosphatidyl choline
PE	phosphatidyl ethanolamine
SDS	sodium dodecyl sulfate
DOC	sodium deoxycholate

## 緒論

### 高等植物におけるイソプレノイド

高等植物におけるイソプレノイド及びその骨格を含む成分の主なものとしてゲラニオール、アブサイシン酸、異常代謝産物としてのイポキサマロン(Ip)、ジベレリン、ステロール、カロチノイド、ゴム乳液、クロロフィル、コエンザイムQやチトキニンなどをあげることができる。これらのイソプレノイドは今日、我々がよく知っているように生理学的に重要な物質である。例えば、サツマイモ塊根組織は黒斑病菌の感染を受けることによって、抗菌性物質(フィトアレキシン)として考えられているIpを主体としたフラノテルペン類を生成する。また植物ホルモンとしてのアブサイシン酸、ジベレリンやチトキニンも植物体を取り巻く外部環境の変化への応答適応に関与する。すなわち、これらは量的に変動し、これによって細胞内の代謝調節が行われている。更に、クロロフィルは光合成色素として高等植物にとって



不可欠のものである。また、植物ステロール(シトステロール、カンパステロール、スチグマステロール)は現在のところ、生体膜の構成成分として考えられている(1)。従って、イソプレノイドの生合成系の進化上の発展なくしては高等植物の進化はあり得なかったと言っても過言ではない。

最近まで、イソプレノイドは多くの天然物化学者に興味ある分野を提供してきた。その結果、動物や微生物においては、その主な代謝経路はほとんど明らかとなった。一方、高等植物体内での代謝経路もかなりわかってきたものの、その生理学的な意義は十分に理解されるまでには至っていない。生理学的意義についてはイソプレノイド生合成の調節機構を解析してこそ発展され得るものであり、今後の重要な研究分野であろう。

### 高等植物でのイソプレノイド生合成経路

黒斑病菌により感染を受けたサツマイモ塊根粗織(罹病粗織)において、*in vivo*で $^{14}\text{C}$ -酢酸及び

$^{14}\text{C}$ -メバロン酸(MVA)の $^{14}\text{C}$ がIpへ取り込まれること(2-4)が明らかにされている。他の高等植物での研究では Bandurski等(5), Bonner等(6,7)によってゴムの生合成が酢酸からなされることが示されたのに始まり, Nicholas(8-11), Bennet等(12,13), Baisted等(14)や Capstick等(15)はMVAがスクワレン更にステロールに転換されることを示した。最近では Hepperと Audley(16)は Hevea brasiliensis latex を用いて in vitro で 3- $^{14}\text{C}$ -3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)の $^{14}\text{C}$ がMVA及びゴムへ取り込まれることを, また Berry等(17)は トウモロコシを用いて in vivo及び in vitro で  $^{14}\text{C}$ -3-hydroxy-3-methylglutaric acidの $^{14}\text{C}$ がカロチノイドに取り込まれることをそれぞれ報告している。

これらのことから高等植物におけるイソプレノイドがアセチルCoA(AcCoA)を出発物質として20余種の一連の酵素反応を経て合成される代謝経路が推定されている(Fig.1)。

### イソプレノイド生合成に關与する酵素

#### 1) AcCoAからのMVAの酵素的合成

哺乳動物及び鳥類の肝臓はMVAを合成するのに2つの独立した経路を持っている。すなわち、その1つは細胞質の酵素系(18,19)であり、他の1つは細胞質酵素とミクロゾーム( $M_s$ )結合酵素-HMG-CoAレダクターゼ(20,21)が関与する系で、主要な経路である。MVAまでの中間代謝産物はCoAと結合した型で進み、まず最初の段階はアセトアセチルCoA( $AcAcCoA$ )4オラーゼ(EC 2.3.1.9)によって2分子の $AcCoA$ が縮合し $AcAcCoA$ が形成する(20,22)。次の段階は $AcCoA$ と $AcAcCoA$ がHMG-CoAシンテターゼ(EC 4.1.3.5)により縮合してHMG-CoAが生成する反応である(20,23,24)。MVAの形成はHMG-CoAのHMG-CoAレダクターゼ(EC 1.1.1.34)による還元によってなされる。この酵素は、ラット肝においてLinn(25,26)により初めて検出されて以来、コレステロール生合成の律速酵素であること(26-29)、日内変動を示すこと(30-34)、正常細胞では最終産物によるフィードバック阻害を受ける(25,28,30,35,36)が、ガン化に伴ってこの阻害感受性を消失する(27,37-40)こと、可逆的な低温失活を示す

こと(41,42)や cAMP 関与の 燐酸化 - 脱燐酸化 による活性の調節を受けること(43-45)などが明らかにされている。

一方、高等植物における MVA の酵素合成に関する研究は少なく、Modi と Patwa (46) によりニンジン根に MVA が存在することや、Oshima と Uritani (47) によりサツマイモ塊根において in vitro で AcCoA から HMG 誘導体の酵素的合成が示されているにすぎない。従って、MVA の合成に関与するものの酵素の存在は実証されていなかった。

## 2) MVA からのスクワレンの酵素的合成

この生合成の第一段階は MVA キナーゼによる反応である。この酵素はイースト(48)、フタ(49,50)及びウサギ肝(51)、ラット子宮(52)、セイヨウカボチャ種子(53)、ゴム細胞(54)、ニワバエ幼虫(55)、五月ササゲ(Phaseolus vulgaris)(56-58)、マツ科植物(Pinus pinaster)の種子とリュウゼツラン(59)で検出された。

次の段階はホスホ MVA キナーゼである。この酵素は Bloch 等(60,61)と Henning (62)によってイーストで検出された。後に、ゴム細胞(63,64)及びラット

(65)とブタ(66,67)の肝臓で抽出, 精製された。

次のMVAピロホスフェート(MVA-PP)デカルボキシラーゼはBlock等(60)によりイーストで検出された後, ゴム細胞(64)及びブタ肝(68,69)でも検出された。

イソペンテニル-PPイソメラーゼは最初にAgrandff等(70)によりイーストで, 次にブタ肝(71-74)とセイヨウカボチャの果実(75)で検出された。

ゲラニル, フルネシル, ゲラニルゲラニルとしてポリイソプレニル-PPはジメチルアリルPPにイソペンテニル-PPの1, 2, 3としてn分子がそれぞれ縮合して形成される。これらの反応を触媒する酵素系はプレニルトランスフェラーゼあるいはプレニル-PP合成酵素と呼ばれている。フルネシル-PPに特異的なプレニルトランスフェラーゼはイースト(76), ブタ肝(73, 77)としてセイヨウカボチャの果実(75)で検出された。ゲラニルゲラニル-PPの合成酵素系はブタ肝(78), Micrococcus lysodeikticus(79), セイヨウカボチャ(80)として Equinocystis macrocarpaの胚乳(81)で検出された。

フルネシル-PPからスクワレンの形成はLynen

(82)によって初めて検出され、ラット(83)、ブタ(84,85)、ウシ(86)そしてトマト果実とニンジン根(87)で検出された。

以上のことから動物と高等植物で現在までに検出された酵素についてまとめたのがTable 1である。このTableでも示されるように、種々の生体組織におけるイソプレノイドの生合成経路については多くの知見が集められ、基本的な代謝過程の全貌はほぼ明らかにされたと言ってよい。しかし、代謝経路の上で代謝産物が無秩序に流れてゆくだけでは生命や自己の独立性を維持することはできないし、内的、外的環境の変化に応答適応し、自己を守ることともできない。長い進化の歴史を通じて、生物は極めて効果的に、あるいは合目的的に代謝を調節する方法を身につけてきた。従って、これらの調節機構が明らかにならない限り、物質代謝の東態の全体像を理解することはできない。この点で、高等動物におけるイソプレノイド生合成(特にコレステロール生合成)の調

第機構の解析は非常に進んでおり、ほとんど HMG-CoA レダクターゼを中心にして、その調節機構をほぼ説明できるようである(88)。更に1973年以降では培養細胞を用いた研究で更に急速な解析が進んでいる(89,90)。

高等植物においてはイソプレノイドの生理的な重要性が明らかになりつつあるにもかかわらず、その生合成に関与する酵素の調節機構の解析はその途についた段階であり、AcCoA から MVA の合成、特に HMG-CoA から MVA の合成に関与する酵素についてはその存在が示唆されているにすぎない。まして全体を通しての調節機構を解明するまでには至っていないのが現状である。

本研究は高等植物におけるイソプレノイド生合成の調節機構を解析する 1 つのアプローチとして、未だに実証されていなかった MVA 形成に関与し、律速段階にあると推定される HMG-CoA レダクターゼに注目して行われた。

サツマイモ (*Ipomoea batatas*, Lam. cv. Norin No. 1)

塊根組織が黒斑病菌 (Ceratocystis fimbriata Ell. and Halst.) の感染を受けると、その相互作用の結果、塊根組織細胞は抗菌性を有する、いわゆるフィトアレキシンに属する  $I_p$  を主体としたフラノテルペン類を少量に生成する。しかし感染を受けない新鮮組織及び単なる切断傷害組織においてはフラノテルペン類は生成されない。このことは黒斑病菌の感染という刺激によって初めてフラノテルペン類の生成に関与する一連の酵素群が形成されることを示している。更に黒斑病菌の感染による以外に、 $HgCl_2$  を投与(91)したり、黒斑病菌抽出液(92)で処理することによってもフラノテルペン類は生成される。

本研究はこのサツマイモ塊根組織に黒斑病菌感染あるいは  $HgCl_2$  投与の系を用いて、HMGR-GALダクタージュがフラノテルペン類の生合成の調節にいかなる関与をしているかを解析するため、主に本酵素の機能と存在状態を解明することを目的とし、以下の点について論じたものである。



- (1) 黒斑病菌感染及び  $\text{HgCl}_2$  投与による HMG-CoA  
レダクターゼの活性変動並びにその細胞内  
局存性
- (2) ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼの活性  
に及ぼす BSA, 基質及び脂質の影響
- (3) ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼの可溶  
化, 部分精製並びにその酵素学的性質

## References

1. Grunwald, C. (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 209 - 236.
2. Akazawa, T. and Uritani, I. (1962) *Agr. Biol. Chem.*, 26, 131 - 133.
3. Akazawa, T., Uritani, I. and Akazawa, Y. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 52 - 59.
4. Oshima, K. and Uritani, I. (1968). *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1146 - 1152.
5. Bandurski, R. S. and Teas, H. J. (1957) *Plant Physiol.*, 32, 643 - 648.
6. Bonner, J. and Arreguin, B. (1949) *Arch. Biochem.*, 21, 109 - 124.
7. Park, R. B. and Bonner, J. (1958) *J. Biol. Chem.*, 233, 340 - 343.
8. Nicholas, H. J. (1961) *Nature*, 189, 143 - 144.
9. Nicholas, H. J. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 1476 - 1480.
10. Nicholas, H. J. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 1481 - 1484.
11. Nicholas, H. J. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 1485 - 1488.
12. Bennet, R. D. and Heftmann, E. (1965) *Phytochem.*, 4, 475 - 479.
13. Bennet, R. D. and Heftmann, E. (1961) *Science*, 134, 671 - 672.
14. Baisted, D. J., Capstack, E. Jr. and Nes, W. R. (1962) *Biochem.*, 1, 537 - 541.
15. Capstack, E. Jr., Baisted, D. J., Newschwander, W. W., Blondin, G., Rosin, N. L. and Nes, W. R. (1962) *Biochem.*, 1, 1178 - 1183.

16. Hepper, C. M. and Audley, B. G. (1969). *Biochem. J.*,  
114, 379 - 386.
17. Berry, D. L., Singh, B. and Salunke, D. K. (1972)  
*Plant & Cell Physiol.*, 13, 157 - 165.
18. Brodie, J. and Porter, J. W. (1960) *Biochem. Biophys.*  
*Res. Commun.*, 3, 173 - 177.
19. Brodie, J., Wasson, G. W. and Porter, J. W. (1962)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8, 76 - 80.
20. Rudney, H. (1957) *J. Biol. Chem.*, 227, 363 - 377.
21. Sugiyama, T., Clindenbeard., Moss, J. and Lane, M. D.  
(1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 255 - 261.
22. Stern, J. R. and Drummond, G. I. (1961) *J. Biol. Chem.*,  
236, 2892 - 2897.
23. Ferguson, J. J. Jr. and Rudney, H. (1959) *J. Biol. Chem.*,  
234, 1072 - 1075.
24. Rudney, H. and Ferguson, J. J. Jr. (1959) *J. Biol. Chem.*,  
234, 1076 - 1080.
25. Linn, T. C. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 984 - 989.
26. Linn, T. C. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 990 - 930.
27. Siperstain, M. D. and Fagan, V. M. (1966) *J. Biol. Chem.*,  
241, 602 - 609.
28. White, L. W. and Rudney, H. (1970) *Biochem.*, 9, 2725 -  
2731.
29. Bucher, N. L. R., Overath, P. and Lynen, F. (1960)  
*Biochim. Biophys. Acta*, 40, 491 - 501.
30. Shapiro, D. J. and Rodwell, V. W. (1969) *Biochem. Biophys.*  
*Res. Commun.*, 37, 867 - 872.

31. Shapiro, D. J. and Rodwell, V. W. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3210 - 3216.
32. Kandutsch, A. A. and Saucier, S. E. (1969) J. Biol. Chem., 244, 2299 - 2305.
33. Shapiro, D. J. and Rodwell, V. W. (1972) Biochem., 11, 1042 - 1045.
34. McNamara, D. J., Quackenbush, F. W. and Rodwell, V. W. (1972) J. Biol. Chem., 247, 5805 - 5810.
35. Bucher, N. L. R., McGarrah, K., Gould, E. and Loud, A. V. (1959) J. Biol. Chem., 234, 262 - 267.
36. Hamprecht, B., Nussler, C. and Lynen, F. (1969) FEBS Lett., 4, 117 - 121.
37. Siperstein, M. D. and Fagan, V. M. (1964) Adv. Enzyme Regul., ed. by G. Wever. vol. 2, pp. 249 - 264.
38. Siperstein, M. D. and Fagan, V. M. (1964) Cancer Res., 24, 1108 - 1115.
39. Siperstein, M. D., Gyde, A. M. and Morris, H. P. (1966) Pro. Natl. Acad. Sci. U. S., 68, 315 - 317.
40. Siperstein, M. D., Fagan, V. M. and Morris, H. P. (1966) Cancer Res., 26, 7 - 11.
41. Brow, M. S., Dana, S. E., Eietschy, J. M. and Siperstein, M. D. (1973) J. Biol. Chem., 248, 4731 - 4738.
42. Heller, R. A. and Gould, R. G. (1974) J. Biol. Chem., 249, 5254 - 5260.
43. Goodwin, C. D. and Margolis, S. (1973) J. Biol. Chem., 248, 7610 - 7613.

44. Beg, Z. H., Allmann, D. W. and Gibson, D. M. (1973)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1362 - 1369.
45. Brown, M. S., Brunschede, G. Y. and Goldstein, J. L.  
(1975) J. Biol. Chem., 250, 2502 - 2509.
46. Modi, V. V. and Patwa, D. K. (1962) Nature, 191, 1201.
47. Oshima, K. and Uritani, I. (1968) J. Biochem., 63,  
617 - 625.
48. Tchen, T. T. (1958) J. Biol. Chem., 233, 1100 - 1103.
49. Levy, H. R. and Popjak, G. (1960) Biochem. J., 75,  
417 - 428.
50. Dorsey, J. K. and Porter, J. W. (1968) J. Biol. Chem.,  
243, 4667 - 4670.
51. Markley, K. and Smallman, E. (1961) Biochim. Biophys. Acta,  
47, 327 - 335.
52. Flint, A. P. F. (1970) Biochem. J., 120, 145 - 150.
53. Loumis, W. D. and Battalle, J. (1963) Biochim. Biophys.  
Acta, 67, 54 - 63.
54. Williamson, I. P. and Kekwick, R. G. O. (1965) Biochem. J.,  
96, 862 - 871.
55. Goodfellow, P. D. and Barnes, F. J. (1971) Insect Biochem.,  
1, 271 - 282.
56. Rogers, L. J., Shah, S. P. J. and Goodwin, T. W. (1966)  
Biochem. J., 100, 14c - 17c.
57. Gray, J. C. and Kekwick, R. G. O. (1969) Biochem. J.,  
113, 37p.
58. Gray, J. C. and Kekwick, R. G. O. (1973) Biochem. J.,  
133, 335 - 347.

59. Garda-Peregrin, E., Suarez, M. D. and Mayor, F. (1973)  
FEBS Lett., 30, 15 - 17.
60. Bloch, K., Chaykin, S., Philips, A. H. and de Waard, A.  
(1959) J. Biol. Chem., 234, 2595 - 2604.
61. Chaykin, S., Law, J., Philips, A. H. Tchen, T. T. and  
Bloch, K. (1958) Pro. Natl. Acad. Sci. U. S., 44,  
998 - 1004.
62. Henning, U., Möslein, E. M. and Lynen, F. (1959)  
Arch. Biochem. Biophys., 83, 259 - 267.
63. Skilleter, D. N., Williamson, I. P. and Kekwick, R. G. O.  
(1966) Biochem. J., 98, 27p.
64. Skilleter, D. N. and Kekwick, R. G. O. (1971) Biochem. J.,  
124, 407 - 417.
65. Levy, H. R. and Popjak, G. (1960) Biochem. J., 75,  
417 - 428.
66. Rilling, H. C. and Bloch, K. (1959) J. Biol. Chem., 234,  
1424 - 1432.
67. Hellig, H. and Popjak, G. (1961) J. Lipid Res., 2,  
235 - 243.
68. Hellig, H. and Popjak, G. (1961) Biochem. J., 80, 47p - 48p.
69. Popjak, G. (1969) Methods Enzymol., ed. by R. B. Clayton.  
vol. 15, pp. 395 - 454.
70. Agranoff, B. W., Eggerer, H., Hennig, U. and Lynen, F.  
(1960) J. Biol. Chem., 235, 326 - 332.
71. Shah, D. H., Cleland, W. W. and Porter, J. W. (1965)  
J. Biol. Chem., 240, 1946 - 1956.

72. Holloway, P. W. and Popjak, G. (1966) *Biochem. J.*, 100, 61p.
73. Holloway, P. W. and Popjak, G. (1966) *Biochem. J.*, 104, 57 - 70.
74. Holloway, P. W. and Popjak, G. (1968) *Biochem. J.*, 106, 835 - 840.
75. Ogura, K., Nishino, T. and Seto, S. (1968) *J. Biochem.*, 64, 197 - 204.
76. Lynen, F., Agranoff, B. W., Eggerer, H., Henning, U. and Mösslein, E. M. (1959) *Angew. Chem.*, 71, 657 - 663.
77. Benedict, C. R., Kett, J. and Porter, K. W. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 611 - 621.
78. Nandi, D. L. and Porter, J. W. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.*, 105, 7 - 19.
79. Kandutsch, A. A., Paulus, H., Levin, E. and Bloch, K. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2507 - 2515.
80. Ogura, K., Shinka, T. and Seto, S. (1972) *J. Biochem.*, 72, 1101 - 1108.
81. Oster, M. O. and West, C. A. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 127, 112 - 123.
82. Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. and Kessel, I. (1958) *Angew. Chem.*, 70, 738 - 742.
83. Goodman, D. S. and Popjak, G. (1960) *J. Lipid Res.*, 1, 286.
84. Krishna, G., Whitlock, H. W. Jr., Feldbruegge, D. H. and Porter, J. W. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.*, 114, 200 - 215.

85. Krishna, G., Feldbruegge, D. H. and Porter, J. W. (1964)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 363 - 369.
86. Anderson, D. G., Rice, M. S. and Porter, J. W. (1960)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 3, 591 - 595.
87. Beeler, D. A., Anderson, D. G. and Porter, J. W. (1963)  
Arch. Biochem. Biophys., 102, 26 - 32.
88. Rodwell, V. W., McNamara, D. J. and Shapiro, D. J.  
(1973) Adv. Enzymol., ed. by A. Meister. vol. 38,  
pp. 373 - 412.
89. Brown, M. S., Dana, S. E. and Goldstein, J. L. (1973)  
Pro. Natl. Acad. Sci. U. S., 70, 2162 - 2166.
90. Brown, M. S., Dana, S. E. and Goldstein, J. L. (1974)  
J. Biol. Chem., 249, 789 - 796.
91. Uritani, I., Uritani, M. and Yamada, H. (1960) Phytopathol.,  
50, 30 - 34.
92. Kim, W. K. and Uritani, I. (1974) Plant & Cell Phyiol.,  
15, 1093 - 1098.
93. Suzuki, H., Oba, K. and Uritani, I. (1974) Agr. Biol. Chem.,  
38, 2053 - 2055.
94. Suzuki, H., Oba, K. and Uritani, I. (1975) Physiol.  
Plant Pathol., 7, 265 - 276.
95. Brooker, J. D. and Russell, D. W. (1974) In Mechanisms  
of Regulation of Plant Growth. ed. by R. L. Bialeski,  
A. R. Ferguson and M. M. Cresswell. pp. 365 - 370.
96. Oba, K., Tatematsu, H., Yamashita, K. and Uritani, I.  
(1976) 58, 51 - 56.



97. Green, T. R., Dennis, D. T. and West, C. A. (1975)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 976 - 982.

Table 1. Characterized enzymes of isoprenoid biosynthesis in higher plants and animals.

Characterized enzymes	Higher plants	Animals
AcAcCoA thiolase	sweet potato root(47)	rat liver(20,22)
HMG-CoA synthetase	sweet potato root(47)	rat liver(20,23,24)
HMG-CoA reductase	sweet potato root (93,94) <u>Pisum sativum</u> (95)	rat liver(25,26)
MVA kinase	pumpkin seedling(53) rubber latex(54) French bean(56-58) <u>Agave americana</u> (45)	pig(49,50) and rabbit(51) livers rat ovary(52)
PhosphoMVA kinase	rubber latex(63,64)	rat(65) and pig(66, 67) livers
MVA-PP decarboxylase	rubber latex(64) sweet potato root(96)	pig liver(68,69)
Isopentenyl-PP isomerase	pumpkin fruit(75) caster bean(97)	pig liver(71-74)
Prenyl transferase	pumpkin fruit(75,80) <u>Equinocystis</u> <u>macrocarpa</u> (81) caster bean(97)	pig liver(73,77)
Squalene synthetase	carrot root(87)	rat(83),pig(84,85) and beef(86) livers

Figures in parentheses represent reference numbers.



# 第一章 黒斑病菌感染及び $\text{HgCl}_2$ 投与による HMG-CoA レダクターゼの活性変動並び にその細胞内局在性

## 緒言

サツマイモ (*Ipomoea batatas*, Lam. cv. Norin No. 1) 塊根組織が黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ell. and Halst.) による感染を受けると、塊根組織細胞内で種々の著しい代謝変動が誘起される。被害部(菌の侵入を受けた組織)におけるイポメアマロンを主体としたフラノテルペン類の著しい蓄積も主な代謝変動の一つである(1-7)。被害部及び隣接健全部(被害部に隣接した健全組織)の両者を含む塊根組織切片に投与された  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸や  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA の  $^{14}\text{C}$  はフラノテルペン類に取り込まれる(3, 8, 9)。更に隣接健全部からの抽出液はアセチル CoA (AcCoA) から 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) 誘導体を合成する活性を有している(10)。これらの事実は感染という刺激によって AcCoA から Ip を主体としたフラノテルペン類の合成

系が隣接健全全部で活発に作動することを示しており、HMG-CoAレダクターゼの活性が増大することが推定される。

最近、HepperとAudley(11)とBerry等(12)は高等植物にHMG-CoAレダクターゼが存在することと示唆したが、その存在の実証的証明はなされなかった。一方、高等動物やイーストでは、MVAはHMG-CoAレダクターゼによるHMG-CoAの還元によって形成されることが実証されており(13, 14), また本酵素がコレステロール合成の律速酵素として機能していることも明らかにされている。(14-17)。

本実験では、高等植物におけるイソプレノイド合成の代謝調節の機構の全体像を理解するという点で、実証されていなかったMVA形成に関与し、律速酵素の可能性のあるHMG-CoAレダクターゼに着目して、その存在を実証化すると共に2, 3の酵素学的性質を解析し、黒斑病菌による感染あるいは $\text{HgCl}_2$ 投与による本酵素活性の変動を調べることを第一の目的と

した。

本酵素の細胞内局在性は種々の生体組織で異なる。例えば、ラット肝(15)においてはミクロゾーム( $M_s$ )のみに、ラット小腸小ノウ腺(crypt)細胞(18)ではミトコンドリア( $M_t$ )と  $M_s$  の両者に局在する。また Saccharomyces cerevisiae (19), Neurospora crassa (20) 及び Tetrahymena pyriformis (21) ではそれぞれ、 $M_t$ ,  $M_s$  及び細胞質(可溶性画分)に存在する。このように種々の生物で異なる局在性を示すこと、更に小腸の crypt 細胞のように、同一細胞内で2つの異なる局在性を示すことはイソプレノイド生合成の代謝調節の機構を理解する上に重要で、酵素の区画化(compartmentalization), 組織化(organization)をその調節の重要な要素として考える必要がある。従って、第2の目的は区画化, 組織化を考慮し、サツマイモ塊根組織における本酵素の細胞内局在性を明らかにすることにおいた。

## 実験方法

## 実験材料

秋に収穫されたサツマイモ (*Ipomoea batatas*, Lam. cv. Norin No. 1) は使用直前まで  $10-13^{\circ}\text{C}$  で貯蔵された。黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ell. and Halst.) を感染させる場合は、サツマイモ塊根を木で十分洗浄後、 $2-3\text{cm}$  の厚さの輪切り切片にし、切断表面に黒斑病菌の内生分生子 (約  $10^7$  個/ml) をフデで塗りつけた。これを沸騰水で十分しめらした紙をしいた木製容器に入れ、同じく、十分しめらした紙でおおい、蓋をして  $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$  の恒温器に入れインキュベートした (以後、このような処理をした組織を罹病組織, diseased tissue と呼ぶ)。また対照としての単なる切断組織 (cut tissue) の場合は、黒斑病菌を接種しない以外は罹病組織の場合と全く同じように処理した。ただし、切断組織の経時的変化 (Fig. 6) においては、 $3\text{mm}$  の厚さのスライスがそのまま用いられた。

$\text{HgCl}_2$  を投与する場合は、まずサツマイモ塊根組織からディスク (厚さ:  $0.4\text{cm}$ , 直径:  $2\text{cm}$ ) を調製

した。そのディスクを蒸留水で洗淨し、付着した水分を口紙で吸い取った後、これを  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  に 18 時間 インキュベートした(前処理, preincubation)。前処理したディスクの切断表面に同じ直径の 3 紙を載せ、これに 0.1%  $\text{HgCl}_2$  を 100  $\mu\text{l}$  投与(浸み込ませる)した後、 $29 \pm 1^\circ\text{C}$  で インキュベートした(以後、この処理をした組織を  $\text{Hg}$ -傷害組織,  $\text{Hg}$ -treated tissue と呼ぶ)。またこれの対照として、 $\text{HgCl}_2$  を投与しないディスクを インキュベートした。

### 基質(RS-3- $^{14}\text{C}$ )-HMG-CoA) の合成とその分離、精製

RS-3- $^{14}\text{C}$ -HMG anhydride を Goldfarb と Pitot (22) の方法を用いて合成し、次に Hilz 等 (23) や Louw 等 (24) による方法に多少の修正 (25) を加えて、その anhydride に CoA を反応させて RS-3- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA を合成した。

合成された 3- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA は Louw 等 (24) の方法に従って分離、精製した。また HMG-CoA の定量は Vignais 等 (26) の方法に従って行われた。

ミトコンドリア及びミクロゾーム画分の調製  
罹病組織及び  $\text{Hg}$ -傷害組織の被害部に隣接し



た健全組織(約1-2mm)を採取した。なお、その対照として、切断組織を用いた。

採取した組織重量の2.5倍量の10mM  $\times$  ルカプトエタノール, 10mM EDTA, 0.5M  $\gamma$ 糖及び0.2量のPolycar ATを含む0.1M 磷酸緩衝液(pH8.0)とともにブレンダーで最高速度をもって15秒間, 3回ホモジナイズした。そのホモジネートを4層に重ねたかごあるいは2層に重ねたナイロンクロスでこした。そのろ液を300 $\times g$ で10分間遠心し, その上清を1mM  $\times$  ルカプトエタノール, 1mM EDTA, 及び0.5M  $\gamma$ 糖を0.05M 磷酸緩衝液(pH7.5)で平衡化したSephadex G-25 (4.5  $\times$  35cm)に通した。これを素通りした蛋白質画分を15,000 $\times g$ で20分間遠心し, 得られた沈殿をMt画分(mitochondrial fraction)とした。更に, その上清を105,000 $\times g$ で2時間遠心し, 得られた沈殿をMs画分(microsomal fraction)とした。

罹病組織及びその対照としての切断組織を用いる実験では, 特に述べない場合, Sephadex G-25を通した後の蛋白質画分を105,000 $\times g$ で2

時間遠心して得られた沈殿を酵素標品として使用した。これを particulate fraction と名付けた。

なお、上記の操作をすべて  $0-4^{\circ}\text{C}$  で行った。

### ヨ糖密度勾配遠心

Mt画分を 32.5%(w/v) ヨ糖を含む 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、その 1ml を 32.5—65%(w/v) の ヨ糖勾配 (16ml) の上に重層した。また Ms 画分を 10%(w/v) ヨ糖を含む 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、その 1ml を 65%(w/v) ヨ糖 (2ml) の上につくられた 10—50%(w/v) の ヨ糖勾配の上に重層した。遠心を、日立 RPS 25-3A ローターを使用し、 $4^{\circ}\text{C}$  において 24,000 rpm で 3 時間行った。遠心後、0.5ml 毎に分画した。本実験においては Mt 画分及び Ms 画分の調製はオロシガネを用い、採取した組織を搾りおろしてホモジネートにした以外はブレンダーによる場合と同様にして行った。

### HMG-CoA レダクターゼの活性測定法

HMG-CoA レダクターゼの活性は、Shapiro 等 (27) 及び飯島と丸山 (28) の方法に従って測定した。

酵素反応溶液 250  $\mu\text{l}$  中には 8mM, G-6-P; 0.124

enzyme unit, G-6-PDH; 8mM, NADP; 12mM, DTT; 2mM, EDTA; 0.35mM, RS-3-[ $^{14}$ C]-HMG-CoA (1,200-1,900dpm/nmole) とび酵素蛋白質 0.1-0.3mg を含んでいた (NADPH generating system とは G-6-P, G-6-PDH とび NADP から成るものである)。反応液を 30°C で 30 分間インキュベートした後, 10N-NaOH 10 $\mu$ l を加えて反応を止め, 20-30 分後に cold の 5% (v/v) MVA ラクトン 20 $\mu$ l と濃塩酸 20 $\mu$ l を加えた。次にこれを 37°C で 20-30 分間インキュベートし, 酵素反応によって生成した MVA を完全にラクトン化した。次に遠心により蛋白質を完全に沈殿させた後, その上清 100 $\mu$ l をシリカゲル G プレートに与えた。その後, アセトニベンゼン (1:1, v/v) で展開し, MVA ラクトンを分離した。展開後, 溶媒を完全に蒸発させてからプレートをヨウ素の蒸気にさらした。この結果, MVA ラクトンの部分 (Rf 0.5-0.7) は黄褐色のバンドを呈した。この部分をスパーテルでバイアルビン内に削り取りながら入れ, 放射能を測定した。なおシンチレーターとして Bray's Cocktail (29) を使用した。

### その他の測定法

サトロロ-4 (cyt.) c オキシダーゼ, NADPH cyt. c レダクターゼと NADH cyt. c レダクターゼ(アンチマイシン A 感受性及び非感受性)及びカタラーゼのそれぞれの活性は Smith (30), Parkes と Thompson (31) 及び Leighton 等 (32) の方法に従って測定した。

フラノテルペン類の定量は Hyodo 等 (33) の方法に従って行った。

蛋白質の濃度は Nessler 法 (34) あるいは Lowry 法 (35) によって定量した。

### 実験結果

一般に本実験において, 特に述べない限りは, 材料として罹病組織(隣接健全部)よりの酵素について行ったものである。

#### HMG-CoA レダクターゼの諸性質

0.1-0.3mg/ml の範囲内の蛋白質濃度では, 30°C で40分以内の反応時間と本酵素活性の関係は直線性が認められた。また至適 pH は 7.3-7.5 であった。

### 1) 酵素活性に対する基質濃度の影響

本酵素活性と基質濃度の関係[Fig.1(a)]は約250  $\mu\text{M}$ の  $\Sigma\text{-HMG-CoA}$ の濃度で最大活性を示し、それ以上の濃度では基質阻害がみられた。また、このデータの Lineweaver-Burk プロット[Fig.1(b)]は直線性を示さず、約50  $\mu\text{M}$ の  $\Sigma\text{-HMG-CoA}$ の濃度で下向きに折れ曲がった。約50  $\mu\text{M}$ 以上及び以下の基質( $\Sigma\text{-HMG-CoA}$ )濃度での見かけ上の  $K_m$ 値はそれぞれ21及び6.5  $\mu\text{M}$ であった。また Hillプロットからの Hill係数は0.81であった。これらの結果は本酵素が負の協同性(negative cooperativity)を有することを示している。

### 2) 本酵素活性に対する EDTA, DTT 及び モノヨード酢酸の影響

EDTA 及び DTT によって酵素活性は増大し、特に DTT は酵素活性に必須である(Fig.2)。このこと及び本酵素活性へのモノヨード酢酸の阻害(Fig.3)から本酵素が SH-酵素であると推定した。

### 3) ミトコンドリア(Mt)画分及びミクロゾーム(Ms)

画分の本酵素活性へのポリジンヌクレオ

## チドの影響

Table 1 で示されているように、罹病組織及び Hg-傷害組織からの Ms 画分の本酵素はその活性に還元基質として NADPH を必要とした。一方、両組織からの Mt 画分の活性については NADPH generating system が存在していなくても一見活性がみられた。この際にみられる活性は、単に NADP, NADH あるいは NAD だけの存在でもみられた (Table 1)。しかも、この活性は Fig. 4(b) で示されるように、ポリインキュベーション中に不活性化されやすく、このことから、この活性は HMG-CoA レダクターゼとは全く別の酵素によるものとみなした。この酵素は HMG-CoA を加水分解する HMG-CoA リアーゼの可能性がある。また NADPH generating system が存在する時の活性はポリインキュベーション中でも安定であり [Fig. 4(b)], HMG-CoA レダクターゼのものであると考えられる。

なお、罹病組織からの Ms 画分の本酵素活性は 30°C でのポリインキュベーションによって急速に失活した [Fig. 4(c)]。

#### 4) 本酵素活性への Triton X-100 とデオキシコレート(DOC)の影響.

シュ糖密度勾配遠心によって得られた  $M_t$  画分と  $M_s$  画分の本酵素活性は Triton X-100 と DOC によって 2-3 倍に増大した (Fig. 5)。しかし, DOC の場合, 約 0.1% (w/v) 以上の濃度ではむしろその活性を阻害した。これらの界面活性剤による活性の増大は本酵素が膜結合酵素として存在していることを示している。

#### 感染及び $HgCl_2$ 投与による本酵素活性とテルペン量の変動

##### (a) 感染による場合

Fig. 6 に示されているように, 新鮮サツマイモ塊根組織には本酵素活性は少ししか検出されなかったが, 感染後, 1 日目から急激に増大し, 2 日目に最大に達した。その後, 3, 4 日と急速に低下した。テルペン量は新鮮サツマイモ塊根組織では認められなかったが, 感染に伴って, 1 日の lag 後, 2 日目から急激に増大し, 3 日目に最大量に達し, 以後は増大

しなかった。一方、対照としての切断傷害については、切断後、1日で本酵素活性は多少の増大はあるが、それ以後、4日目まではほぼ一定であった。なお、テルペン類は検出されなかった。

#### (b) $HgCl_2$ 投与の場合

Fig. 7(a) に示されているように、前処理( $29 \pm 1^\circ C$ , 18時間)後、 $HgCl_2$  投与した場合、Mt画分の本酵素活性は約2時間後に一時低下した。その後、増大し、約8時間後に最大に達した後、再び低下した。またMs画分では、前処理(18時間)直後では本酵素活性は検出されなかったが、 $HgCl_2$  投与後、1-2時間のlag後、急激に増大し、約6時間で最大に達し、以後減少した。テルペン量は $HgCl_2$  投与後、8時間位まで増大し、それ以後12時間まではほとんど増大しなかった。一方、対照としての切断組織については、本酵素活性はMt画分にのみ見出され、切断後、しばらくの間は、この画分の活性は変動しなかったが、それ以後(12-24時間)、約2倍に増



大した。テルペン類はこの期間中ほとんど検出されなかった[Fig. 7(b)]。

以上のことから、感染あるいは  $\text{HgCl}_2$  投与によつて初めて、特に  $M_s$  画分において、本酵素活性が顕著に増大するものと考えられ、これと平行してテルペン類が生成される。

### 本酵素の細胞内局在性

本酵素及び他の膜結合酵素の細胞内局在性を遠心分画によつて分析した結果(Fig. 8), 本酵素は新鮮組織及び切断組織では  $M_t$  画分にのみその活性が検出されたが、罹病組織では  $M_t$  画分以外に  $M_s$  画分と  $105,000 \times g$  可溶性画分(supernatant fraction)にも活性が認められた。更に、本酵素の局在性をヨ糖密度勾配遠心によつて分析したところ(Fig. 9), 実際に、新鮮組織と切断組織においては  $M_t$  [Fig. 9(a)] にのみ、また罹病組織では  $M_t$  と  $M_s$  の両者[Fig. 9(b)] に局在することが明らかとなった。これらの結果は  $\text{Hg}$ -傷害組織における本酵素の局在性(Fig. 7)と一致する。

以上のことから、感染あるいは  $\text{HgCl}_2$  投与に

て初めて生成するテルペン類の合成には  
Msに局在するHMG-CoAレダクターゼが関与してい  
ると考えられた。

### 考察

#### 高等植物におけるHMG-CoAレダクターゼの存在

筆者はサツマイモ塊根組織においてHMG-CoA  
レダクターゼが存在することを証明した。また  
BrookerとRussell(36)も Pisum sativum の発芽種子の  
ホモジネートを用いて、本酵素の存在を示した。  
一方、Potty(37)はオレンジ果実ではMVAが検出  
されるにもかかわらず、HMG-CoAレダクターゼの  
活性が認められないことを報告している。し  
かし、彼の用いた酵素液の調製法(組織のホモ  
ジネートの調製に1M Tris-HCl緩衝液、pH 8.0のみが使  
用され、還元剤、キレート剤が含まれていない)  
及び活性測定法(NADPHの340nmでの吸光度変化)に  
は問題があり、活性が相当地に強くない限り、

検出不可能であると考えられる。従って、一般に高等植物における MVA の合成、更にはイソプレノイド生合成に HMG-CoA レダクターゼが関与していることは筆者の研究等によって確立されたと言える。

### 感染及び $HgCl_2$ 投与に伴う HMG-CoA レダクターゼの活性変動並びにその細胞内局在性

#### 1) Ms 結合 HMG-CoA レダクターゼ

新鮮組織及び切断傷宮組織では Ms に本酵素活性は検出されない [Fig. 7(b), 8]。しかし、感染及び  $HgCl_2$  投与によって初めて Ms に本酵素活性が出現し、急激に増大し、その後減少し、[Fig. 6, 7(a), 8]、これと平行してテルペン量が変動した [Fig. 6, 7(a)]。これらの事実は Ms に局在する HMG-CoA レダクターゼがテルペン類の合成に関与することを強く示している。また本酵素はその活性変動様式からテルペン類の生合成の律速段階にある可能性がある。このことは本酵素活性の変動様式が Oba 等 (38) が示した MVA-PP デカルボキシラーゼの活性変動様式と異なる

(この酵素は感染後、増大し、3日目まで活性は維持される)ことから言える。

今後の課題として、本酵素の活性変動が酵素量の変化であるか、単なる活性の変化であるかを解析する必要がある。

## 2) $Mn$ 結合 HMG-CoA レダクターゼ

罹病組織及び Hg-傷害組織において、 $Mn$ 結合 HMG-CoA レダクターゼとして検出した活性がすべて本酵素に由来するものであるとすることに多少の問題はあるが、還元基質として NADPH が存在する場合とそうでない場合とでは明らかに異なる酵素活性を測定していること [Fig. 4(b)] から、NADPH が存在する場合の活性は、そのほとんどが本酵素のものであると考えられる。

NADPH 等のジスウレオチドが存在しない時に検出される活性は HMG-CoA リアーゼ (EC 4.1.3.4) であると考えられる。その理由として、第一にこの酵素による  $3-^{14}C$ -HMG-CoA の分解産物である  $3-^{14}C$ -アセト酢酸は、HMG-CoA レダクターゼの活性測定条件下の薄層クロマトグラフィーにおける

その Rf 値は MVA ラクトンと近似であること、  
第二に、動物においては Mt に HMG-CoA リアーゼが  
局在すること (39) があげられる。

Mt に局在する本酵素の生理的意義は明らか  
ではない。しかしイースト (40) とび *castor bean* の胚  
乳 (41) においてイソプロピル-PP イソメラーゼ  
とび プレニルトランスフェラーゼが Mt に局在する  
ことが報告されており、Mt 自体がイソプレノ  
イド生合成系 (例えばコエンザイム Q の合成系) を  
持っていると考えられる。

プロラステド (クロロプロラステ) にも HMG-CoA レダ  
クターゼが局在すること (36) や Goodwin 等 (42) によっ  
てカロチノイドやステロール等の合成系が存在す  
ることが示されている。Goodwin 等 (42) はクロロ  
プロラステの内外にはイソプレノイド生合成に  
必要な同種の酵素系 (AcCoA シンテターゼから プレ  
ニルトランスフェラーゼ) が存在するが、ステロール、  
カロチノイドやプロラステキノンなどのクロロ  
プロラステに特有なイソプレノイドの生合成に  
必要な酵素系はクロロプロラステ内にしか局在

しないとし、このような enzyme segregation が高等植物におけるイソプレノイド生合成の主要な調節機構であると考えている。

以上のことから、高等植物における種々のイソプレノイドの生合成系は Mt, クロロプラスト(プロラチド)及び Ms(可溶性画分を含める)の3つに大別される系が存在し、それぞれの系は植物体の発育、分化の過程や環境の変化に対応して、高度に調節されているものと推定される。

## References

1. Hiura, M. (1943) Report from Gifu Agriculture College, 50, 1 - 5.
2. Kubota, N. and Matuura, T. (1953) J. Chem. Society of Japan, 74, 248 - 251.
3. Akazawa, T. and Uritani, I. (1962) Agr. Biol. Chem., 26, 131 - 133.
4. Imaseki, H., Takei, S. and Uritani, I. (1964) Plant & Cell Physiol., 5, 119 - 132.
5. Yang, D. T. C., Wilson, D. J. and Harris, T. M. (1970) Phytochem., 10, 1653 - 1654.
6. Kato, N., Imaseki, H., Nakashima, N. and Uritani, I. (1971) Tetrahedron Lett., 13, 843 - 846.
7. Oguni, I. and Uritani, I. (1974) Plant Physiol., 53, 649 - 652.
8. Akazawa, T., Uritani, I. and Akazawa, Y. (1962) Arch. Biochem. Biophys., 99, 52 - 59.
9. Oshima, K. and Uritani, I. (1968) Agr. Biol. Chem., 32, 1146 - 1152.
10. Oshima, K. and Uritani, I. (1968) J. Biochem., 63, 617 - 625.
11. Hepper, C. M. and Audley, B. G. (1969) Biochem. J., 114, 379 - 386.
12. Berry, D. L., Singh, B. and Salunkhe, D. K. (1972) Plant & Cell Physiol., 13, 157 - 165.
13. Linn, T. C. (1967) J. Biol. Chem., 242, 984 - 989.

14. Linn, T. C. (1967) J. Biol. Chem., 242, 990 - 993.
15. Bucher, N. L. R., Overath, P. and Lynen, F. (1960)  
Biochim. Biophys. Acta, 40, 491 - 501.
16. Siperstein, M. D. and Fagan, V. M. (1966) J. Biol. Chem.,  
241, 602 - 609.
17. White, L. W. and Rudney, H. (1970) Biochem., 9, 2725 - 2731.
18. Shefer, S., Hauzer, S., Laper, V. and Mosbach, E. H.  
(1972) J. Lipid Res., 13, 402 - 412.
19. Shimizu, I., Nagai, J., Hatanaka, H., Saito, E. and  
Katsuki, H. (1971) J. Biochem., 70, 175 - 177.
20. Imblum, R. L. and Rodwell, V. W. (1974) J. Lipid Res.,  
15, 211 - 222.
21. Beedle, A. S., Munday, K. and Wilton, D. C. (1974)  
Biochem. J., 142, 57 - 64.
22. Goldfarb, S. and Pitot, H. (1971) J. Lipid Res., 12,  
512 - 515.
23. Hilz, H., Knappe, J., Ringelman, E. and Lynen, F. (1958)  
Biochem. Z., 329, 476 - 489.
24. Louw, A. T., Bekersky, I. and Mosbach, H. (1969)  
J. Lipid Res., 10, 683 - 686.
25. Suzuki, H., Oba, K. and Uritani, I. (1975) Agr. Biol. Chem.,  
39, 1675 - 1676.
26. Vignais, P. V. and Zabin, I. (1958) Biochim. Biophys. Acta,  
29, 263 - 269.
27. Shapiro, D. J., Imblum, R. L. and Rodwell, V. W. (1969)  
Anal. Biochem., 31, 383 - 390.



28. 飯島康輝, 丸山素弘. (1973) 脂質生化学研究, 15, 164 - 167.
29. Bray, G. A. (1960) Anal. Biochem., 1, 279 - 285.
30. Smith, I. (1954) Methods of Biochemical Analysis, ed. by K. Glick. vol. 2, pp. 427 - 434.
31. Parkes, J. G. and Thompson, W. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 196, 162 - 169.
32. Leighton, F., Poole, B., Beaufey, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S. and de Duve, C. (1960) J. Cell Biol., 37, 482 - 513.
33. Hyodo, H., Uritani, I. and Akai, A. (1969) Phytopath. Z., 65, 332 - 340.
34. Johnson, M. J. (1941) J. Biol. Chem., 137, 575 - 586.
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265 - 275.
36. Brooker, J. D. and Russell, D. W. (1974) In Mechanisms of Regulation of Plant Growth, ed. by R. L. Bialeski, A. R. Ferguson and M. M. Cresswell. pp. 365 - 370.
37. Potty, V. H. (1969) J. Food Sci., 34, 231 - 234.
38. Oba, K., Tatematsu, H., Yamashita, K. and Uritani, I. (1976) Plant Physiol., 58, 51 - 56.
39. McGarry, J. D. and Foster, D. W. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4251 - 4256.
40. Momose, K. and Rudney, H. (1972) J. Biol. Chem., 247, 3930 - 3940.
41. Green, T. R., Dennis, D. T. and West, C. A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 976 - 982.

42. Rogers, L. J., Shah, S. P. J. and Goodwin, J. W. (1966)  
Biochem. J., 99, 381 - 388.

Table 1. Effects of pyridine nucleotides on mitochondrial or microsomal HMG-CoA reductase activity

Deletions	Additions	Mevalonate formed (nmole/30min/mg)			
		Mt fractions from		Ms fractions from	
		Hg-treated tissue	Diseased tissue	Hg-treated tissue	Diseased tissue
None (complete) <sup>a</sup>	None	0.271 (100)	0.135 (100)	0.221 (100)	2.54 (100)
NADP	None	—	—	0 ( 0 )	—
NADPH regenerating system	None	0.104 (38.4)	0.045 (33.3)	0 ( 0 )	—
NADPH regenerating system	8mM NADP	0.041 (15.1)	0.047 (34.8)	0.001 (0.5)	—
NADPH regenerating system	8mM NADH	0.066 (24.9)	0.024 (17.8)	0.001 (0.5)	0.005 (0.2)
NADPH regenerating system	8mM NAD	0.042 (15.5)	0.051 (37.8)	0.008 (3.6)	—
NADPH regenerating system	8mM NADH 8mM NADP 0.5mM ATP	0.034 (12.5)	0.020 (14.8)	0.006 (2.7)	—

a, standard assay conditions.

Mitochondrial and microsomal fractions were prepared in the presence of 1% (w/v) BSA from Hg-treated and diseased tissues, respectively. Figures in parentheses represent relative activities.

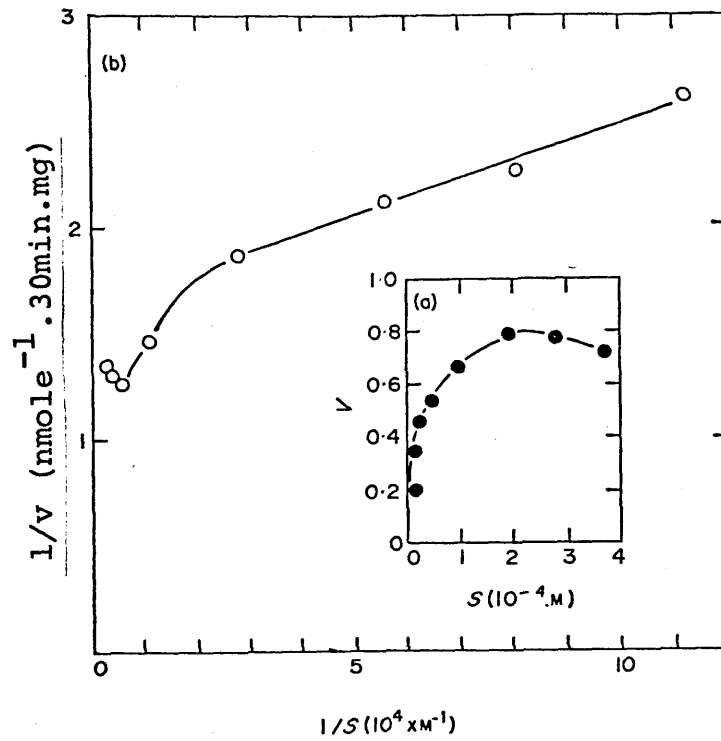


Fig. 1. Effect of substrate concentration on HMG-CoA reductase activity in the particulate fraction from diseased tissue.

(a) and (b) show the effect of different concentrations ( $S$ ) of  $\underline{S}$ -HMG-CoA on enzyme activity ( $v$ ) and the corresponding Lineweaver-Burk plot, respectively.

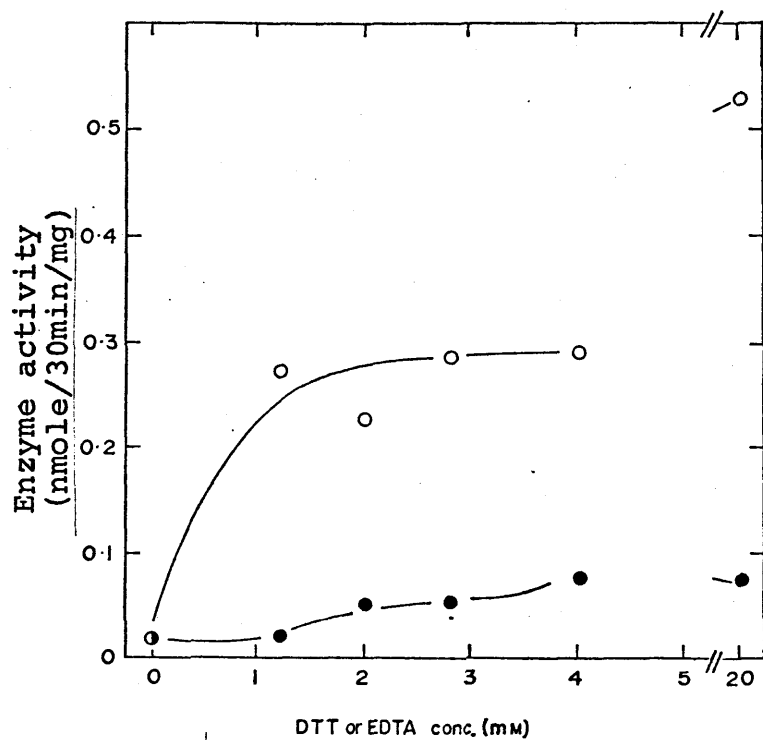


Fig. 2. Effect of DTT (○) or EDTA (●) on HMG-CoA reductase activity in the particulate fraction from diseased tissue.

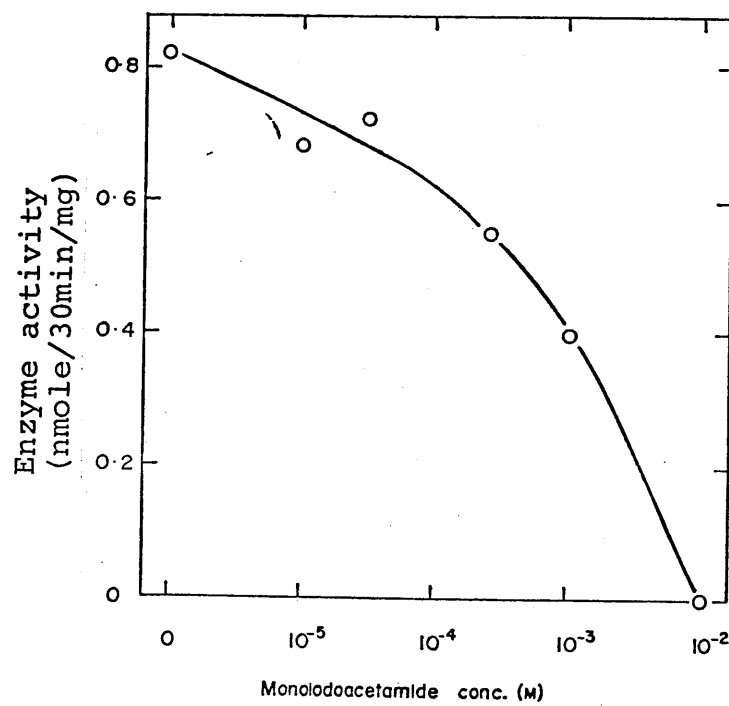


Fig. 3. Effect of monoiodoacetamide on HMG-CoA reductase activity in the particulate fraction from diseased tissue.

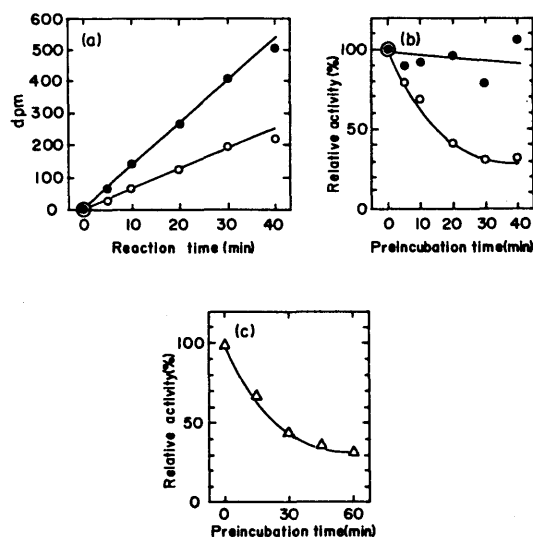


Fig. 4. (a) Relationship between enzymic activities and reaction time. (b) Effect of preincubation at 30°C on enzymic activities. Mitochondrial fraction was prepared from Hg-treated tissue according to Experimental Methods except for the presence of 1% (w/v) BSA during the preparations. ● —● and ○ —○, enzyme assays were performed in the presence and absence of NADPH regenerating system, respectively. The other ingredients were contained according to Experimental Methods. (c) Effect of preincubation at 30°C on microsomal HMG-CoA reductase in diseased tissue. Microsomal fractions were prepared in the absence of BSA during the preparations.

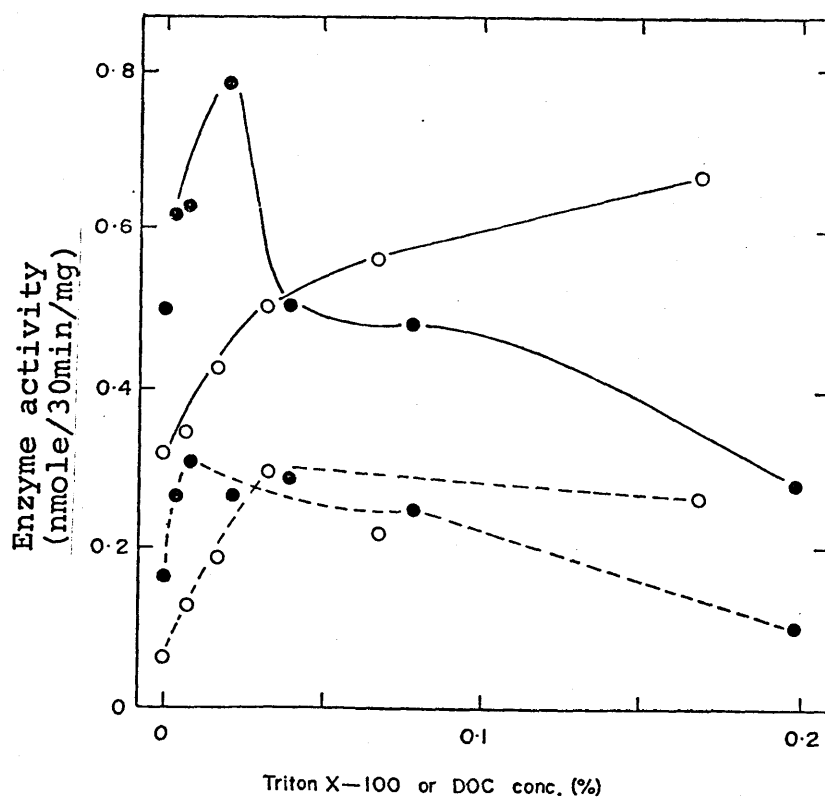


Fig. 5. Effect of Triton X-100 (○) or DOC (●) on HMG-CoA reductase activity in the microsomal (—) or mitochondrial (----) fraction of diseased tissue, prepared after sucrose density gradient centrifugation.



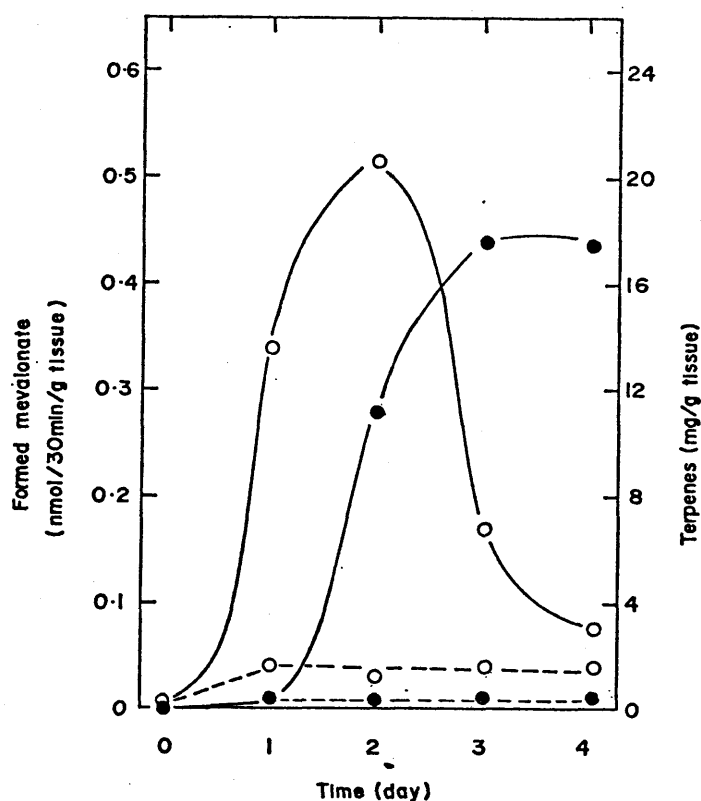


Fig. 6. Changes in HMG-CoA reductase activity and terpene contents after fungal infection or slicing. Particulate fractions from diseased and cut (as control) tissues incubated for various periods were used for the assay of HMG-CoA reductase. The infected regions (about 0.5 to 1.5 mm thick) and tissues sliced (3 mm thick) from cut tissue were used for determination of terpenes in diseased and cut tissues, respectively. At zero time, fresh tissue was used. (O), activity of HMG-CoA reductase; (●), contents of terpenes. — and ----, diseased and cut tissues, respectively.

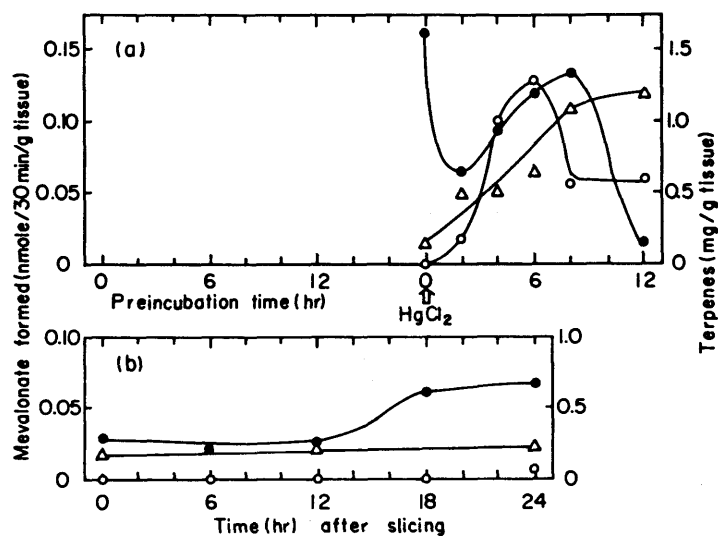


Fig. 7. Changes in HMG-CoA reductase activity and terpene content after  $\text{HgCl}_2$  administration (a) or after slicing (as control, b). Experimental procedures were the same as described in Experimental Methods. ●—● and ○—○, changes in activities of HMG-CoA reductase in mitochondrial and microsomal fractions, respectively. Δ—Δ, changes in terpene contents.

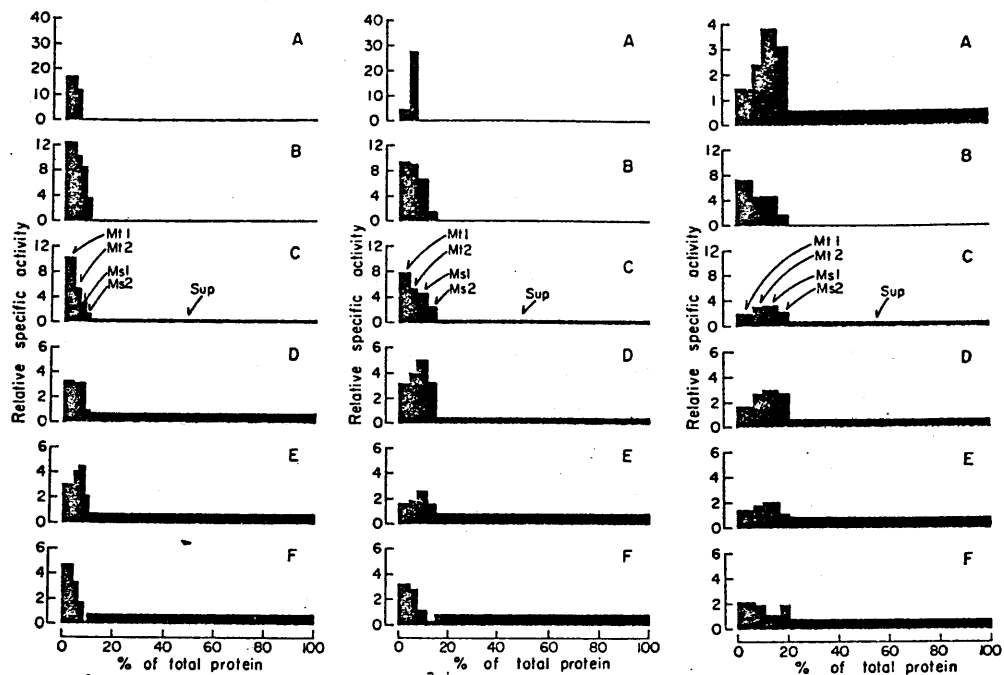


Fig. 8. Subcellular distribution patterns of HMG-CoA reductase and other membrane-bound enzymes in fresh, cut and diseased tissues by differential centrifugation. Each fraction was prepared from fresh (left), cut (center) and diseased (right) tissues by differential centrifugation, respectively. % of total protein: ratio (%) of protein content in each fraction to the sum (100%) of all fractions; relative specific activity: ratio (%) of activity in each fraction to the sum of activity in each fraction / each % of total protein. Fractions are indicated in the order of sedimentation from left to right: Mt 1 (300xg, for 10 min - 7,000xg, for 20 min), Mt 2 (7,000xg, for 20 min - 15,000xg, for 20 min), Ms 1 (15,000xg, for 20 min - 30,000xg, for 1 hr), Ms 2 (30,000xg, for 1 hr - 105,000xg, for 2 hr) and Sup. (105,000xg - supernatant). A : HMG-CoA reductase, B : cyt. c oxidase, C : NADH cyt. c reductase, D : antimycin A insensitive NADH cyt. c reductase, E : NADPH cyt. c reductase, F : catalase.

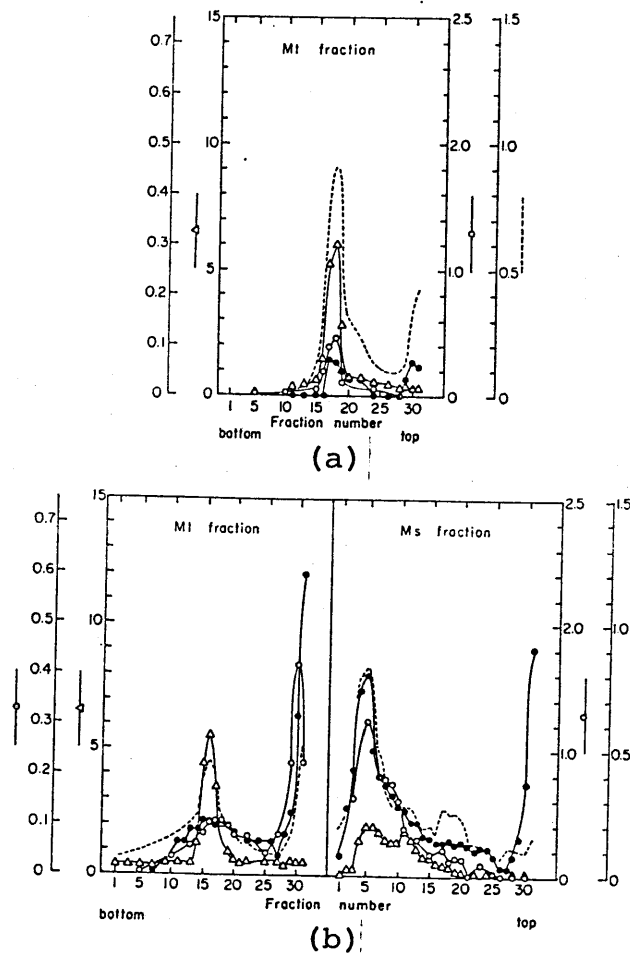


Fig. 9. Distribution patterns of HMG-CoA reductase and mitochondrial and microsomal marker enzymes on sucrose density gradient centrifugation. Mt fraction or Mt and Ms fractions were prepared from fresh (a) or diseased tissue (b), using homogenization and elution media containing 1% (w/v) BSA and subjected to sucrose density gradient centrifugation as described in Experimental Methods. Ms fraction was washed with suspension medium (0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.5 M sucrose, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT) before being loaded at the top of the gradient.  $\circ$  —  $\circ$  , activity of HMG-CoA reductase (nmole of mevalonate formed in 30 min per tube);  $\bullet$  —  $\bullet$  , activity of NADPH cyt. c reductase (increase in absorbance at 550 nm per min per tube);  $\Delta$  —  $\Delta$  , activity of cyt. c oxidase (decrease in absorbance at 550 nm per min per tube); ---- , mg of protein per tube.

## 第二章 ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼ の活性に及ぼす BSA, 基質及び脂 質の影響

### 緒言

第一章で述べたように、本酵素はミトコン  
ドリア (Mt) とミクロゾーム (Ms) に局在し、Ms に見出  
された HMG-CoA レダクターゼが黒斑病菌による感  
染や  $HgCl_2$  投与によって生成するテルペン類の合  
成に関与するとみなしてよい。従って、本章  
では Ms 結合 HMG-CoA レダクターゼの活性に及ぼす  
諸因子に関する実験を行った。

本酵素は膜結合酵素である。膜結合酵素は  
一般に、膜内でのみ正常な生理的機能にあず  
かっていると同時に膜構造を形成しており、  
機能は構造に依存して発現される。従って、  
この両者を切り離しては考えられない。すな  
わち、膜結合酵素は多少少なかれ、膜内の  
脂質や他の蛋白質分子と相互に作用しており、  
可溶性酵素と比較して、これらがその構造す

なうち機能を変化させたり, あるいは調節する要素(例えばエフェクター)が多いと考えられる。このことは膜結合酵素(あるいは蛋白質分子)を可溶化した場合, 機能的性質が変化するという事実(1-8)からも言える。このような可溶化に伴って性質が変化する現象は Racker (2) によって アロトピー (allotopy) と呼ばれた。このような膜結合酵素の特徴は同時に可溶化, 精製の困難さのため, その酵素学的機能を研究する上での限界ともなっている。

膜結合酵素の機能を解析する場合, その基礎となるのはより高い酵素活性を保持した目的の膜系をより純粋かつ intact に分離することである。しかし, 動物の場合と比較して, 高等植物では細胞内顆粒を純粋かつ intact に分離するには多くの不利な面があり, 未だに一般的な調製法が確立されていないといつてよい。特に Ms の分離は困難である。そこで本章では不均一な膜系ではあるが, HMG-CoA レダクターゼを可能な限り intact な状態に保持する Ms 画分を

調製することを第一の目的とした。

更に、第一章の Fig. 4(c) で示したように、本酵素は膜結合の状態で不安定であり、30°C でアラインキレーションを行くと、急速に失活する。従って、第二の目的は第一の目的と密接に関係するが、今後の実験の遂行のために本酵素の不安定性の原因とその安定化法を解明することとした。

## 実験方法

### 実験材料及びミクロゾーム(Ms)画分の調製

第一章で述べたように黒斑病菌—サツマイモ塊根組織の系を用いた。Ms 画分の調製は被害部隣接健全部をオロシガネで摺りおろす方法でホモジナイズした以外は第一章で述べた通りである。なお調製した Ms 画分を一度洗浄したものを使用した (Table 2, legend 参照)。

### Ms 画分からの磷脂質と遊離脂肪酸 (FFA) の調製と定量

磷脂質は Folch 等 (9) の方法に従って抽出した。

抽出した脂質画分からの遊離脂肪酸(FFA)の除去は薄層クロマトグラフィー〔シリカゲルG, 厚さ: 0.75 mm, 展開溶媒: 石油エーテル/エーテル/酢酸(80:30:1, V/V/V)] (10)によつて行った。この系では, 極性脂質(サツマイモ塊根組織のMs画分中には99%の糖脂質が存在すると思われるが, ほとんどは磷脂質である)は原点に上まるが, FFA, ステロール及び中性脂質は展開される。展開後, 原点付近のシリカゲルをかき取り, 磷脂質を5mlのクロロホルム/メタノール(2:1, V/V)で3回抽出した。このようにして得られた磷脂質はAllen (11)の方法に従つて定量した。

1mlのMs懸濁液に20%(w/v)トリクロロ酢酸を0.5mlの割合で混合した後, 含まれているFFAを2.0mlのメーキサンで3回抽出した。抽出液は窒素気流中で乾固した後, 少量のエーテルに溶かし, 上記した薄層クロマトグラフィーと同じ系で展開し, FFAを分離した。展開後, プレートをヨウ素蒸気にさらし, 黄褐色に呈したFFAの部分(Rf 0.2-0.4)をかき取り, それから



FFA を 1% (V/V) ギ酸を含む 2.0ml のエーテルで 3 回抽出した。この抽出液を窒素気流中で完全に乾固した後、ジアゾメタン含有のエーテル溶液に溶かし、メチルエステル化を行った。このようにして調製した FFA のメチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析、定量した(12)。

FFA のメチルエステルのガスクロマトグラフィーによる分析は 15% EGS [Chromosorb W (60-80 mesh) にコートされた ethyleneglycol succinate] を充填したスチールカラム (0.3 × 190 cm) を使用して行われた。カラム 及び インジェクターとディテクターの温度はそれぞれ、170°C 及び 200°C であった。またキャリアガスとして窒素を使用し、この圧力は 8 kg/cm<sup>2</sup> であった。FFA の定量はピークの重量を測定することによって行われた。標準曲線は、種々の脂肪酸のメチルエステルが一定量の割合で含まれた標準試薬(シグマ社)を使用し、モル濃度に対し、ピーク重量をプロットすることによって作製し、これを基にして、試料の濃度を定量した。

## 酵素活性測定及び蛋白質定量

HMG-CoA レダクターゼ, サトクローム (cyt.) C オキシダーゼ, アンチマイシン A 非感受性 NADH cyt. C レダクターゼ及び NADPH cyt. C レダクターゼの活性は第一章で述べた方法で測定した。また蛋白質濃度は Lowry 等(13)の方法で測定した。

### 実験結果

#### $M_s$ 結合 HMG-CoA レダクターゼのポリインキュベーション中の失活とその温度依存性

本酵素は  $30^{\circ}\text{C}$  でポリインキュベートすると急速に失活した (Fig. 1)。この失活は温度に依存しており, ポリインキュベートする温度に対する残存活性の Arrhenius プロットは  $20^{\circ}\text{C}$  付近で折れ曲がった (Fig. 2)。このプロットから算出される活性化エネルギーは  $20^{\circ}\text{C}$  以下では  $2,900 \text{ cal/mole}$  またそれ以上の温度では  $14,000 \text{ cal/mole}$  となり, この不活性化が単なる熱失活によるというより, まるる酵素的な反応に起因するものであることが示唆された。

## 本酵素の不活性化に対する BSA 及び基質の 影響

本酵素の不活性化の抑制法として多くの試みが行われたが、牛血清アルブミン(BSA, Fraction V, ジグマ社)が最も有効であることがわかった。Fig. 3 で示されているように、酵素反応液に高濃度(0.6-1.2%, w/v)の BSA を加えることによって活性が高められた。また Table 1 は Ms 画分を 1% (w/v) BSA の存在で調整することによって、特にアンチマイシン A 非感受性 NADH cyt. c レダクター及び HMG-CoA レダクターの活性が 2-2.5 倍に高められたことを示している。また Fig. 1 で示されているように、1% (w/v) BSA を反応液に加えた場合、ポリインキュベーションによる失活を抑制するだけでなく、活性が増大することがわかった。更に、ポリインキュベーション中に BSA を添加しても不活性化の抑制効果は認められた。しかし、ポリインキュベーションをしない時の活性までに回復することにはなかった(Fig. 4)。

以上のことから、本酵素の高い活性を保持

している Ms 画分を得るためにはその調製の全過程で BSA が存在していることが必須であることがわかった。

BSA 以外にも、本酵素のポリインキュベーションによる失活は基質である HMG-CoA と NADPH の両者によって抑制された (Fig. 5)。しかし、HMG-CoA あるいは NADPH のどちらか一方だけでは失活の抑制効果は認められなかった (Fig. 5)。

### ポリインキュベーションによる本酵素の失活の機序

ポリインキュベーション中の本酵素の失活には少なくとも二つの可能性が考えられた。その一つは、調製中並びにポリインキュベーション中に生成した遊離脂肪酸 (FFA) が本酵素活性を抑制することである。他の一つは、調製中並びにポリインキュベーション中に脂質分解酵素によって、Ms の脂質が分解され、本酵素を取り巻いている脂質の環境が乱され、その結果、本酵素の構造が不安定なものへ変化し、ひいては失活するためである。先に述べた BSA の失活抑制

の効果はいずれの可能性によっても説明されることとなる。

まず、前者の可能性を検討するため、調製されたMs画分にFFAが存在するか否かを調べた。その結果、相当量のFFAが検出された(Table 2, 3)。主なFFAはパルミチン酸とリノール酸であった(Table 3)。更に、1%(w/v) BSAの存在のもとでMs画分を調製することによって40-60%のFFAが除去されることがわかった(Table 2)。次に主なFFAであるパルミチン酸とリノール酸の本酵素活性への影響を調べた(Fig. 6)。その結果、これらの阻害効果は認められず、並に活性を高めた。これはSDS(sodium dodecyl sulfate)で認められた(Fig. 6)ような界面活性剤としての性質によるものと考えられた。従って、BSAによるFFAのMsからの除去は認められるものの、これが直接、酵素活性を高めたり、保持したりするものではないことが明らかとなった。すなわち、第一の可能性は考えがたい。

次の可能性を検討するため、まずポリイン

キュベーション中に脂質が分解されるか否かを検討した。Fig. 7 はアリインキュベーション中に本酵素活性が急速に失われる一才、これと相関関係をもつて FFA が増大すること、すなわち Ms の脂質がホスホリパーゼ A 活性を有する分解酵素によって分解されることを示している。このように膜脂質の分解に伴って、膜酵素が失活する現象は、その酵素が膜脂質と強い相互作用を保持しており、その機能の正常な発現に脂質の存在が必要であることを示している。換言すれば、酵素蛋白質分子のコンホメーションを至適な状態に保つのに膜脂質が必要であり、脂質が酵素機能の調節に重要な役割を果たしている可能性がある。従って、本酵素がいちゆる脂質依存性の酵素である可能性が十分にある。このような脂質依存性を示す Ms 結合酵素として、ステアリル GA デサチュラーゼ(14)、グルコース 6-ホスファターゼ(15)及び NADH cyt. c レダクターゼ(16, 17)などが知られている。そこで脂質依存性を示す酵素として NADH cyt. c レダクターゼとそう

でない NADPH cyt. c レダクターゼの活性への フリ  
インキベーションによる影響を調べた (Fig. 8)。その  
結果、脂質依存性を示す NADH cyt. c レダクターゼ  
の活性は フリインキベーションによって約 50% の  
活性が失われたのに対し、そうでない NADPH  
cyt. c レダクターゼの活性は約 20% しか失われな  
かった (なお、これらの失活に対する BSA の  
抑制効果は認められなかった)。この結果は  
HMG-CoA レダクターゼが脂質依存性であることを  
支持するものである。

次に本酵素の フリインキベーションによる失活  
が外から添加された磷脂質によって抑制され  
るか否かを調べた (Fig. 9)。その結果、調製され  
た Ms 画分から抽出した FFA を含まない磷脂質  
(ミセルとして加えた) によって、その失活はほ  
とんど抑制された。

以上のことから、本酵素の フリインキベ  
ーションによる失活の原因として、Ms に結合してい  
ると考えられるホスホリパーゼ A 活性を持った  
脂質分解酵素による脂質の分解が、本酵素の

構造的不安定化を引き起こすことによるものと考えられた。なお、この不安定化を BSA が抑制することとなる。

## 考察

### M<sub>s</sub>結合 HMG-CoA レダクターゼの不活性化

BSA は機能活性を高度に保持した細胞内顆粒を単離するため  $\times$  ディウム中に含まれるべき成分であることが、クロロプラスト(18)や Mt(19)について報告されている。このようなことから BSA の機能として、それが脂質分解酵素を阻害するものではなく、細胞内顆粒の調節中に脂質分解酵素の反応によって生成した、あるいは元来細胞内に存在していた FFA を結合、除去することによって膜の構造的損傷や膜結合酵素(蛋白質分子)の変性を抑えるものと考えられてきた(19)。実際に、FFA によって Mt の膨潤(20)、クロロプラストの構造変化(21)、チトクローム P-450 とチトクローム b<sub>5</sub> の変性(22)やグルコース 6-ホスファターゼの失活(23,24)が引き起こされるこ



とが報告されている。更に、ホスホリパーゼ C (17, 25) や 膵臓の リパーゼ (24) で  $M_s$  を処理した時、グルコース 6-ホスホターゼは失活するが、この失活は高濃度の BSA によって抑制されることも報告されている。確かに、膜酵素によって、FFA により不活性化されたり、これが BSA によって抑制されたりすることもある。然し、サツマイモの HMG-CoA レダクターゼの場合には、そうではないと考えてよい。

すなわち、サツマイモ塊根組織における  $M_s$  結合 HMG-CoA レダクターゼの場合では、その失活は Fig. 6 で示したように、FFA そのものによるものではなく、磷脂質の分解による膜構造の損傷によるものとみなしている。そして、この結果、引き起こされる本酵素の不安定化を BSA が抑制するものと考えられる。

また、本酵素の失活はプロテアーゼによるとみられるかもしれない。このことは BSA がその基質となり、結果として、本酵素へのプロテアーゼの攻撃から保護するとしても説明され

るからである。しかし、一度洗浄されたMs画分にアロテア-ビが存在する可能性は極めて少ないと考えられ、アロテア-ビによる本酵素の失活の可能性は除去され得よう。

筆者や他の研究者により報告された種々の膜系での結果から、本酵素のプリインホーバージョンによる失活は、Msに結合(局在)していると考えられる脂質分解酵素による脂質の分解のため本酵素の活性型が不活性型に転換される結果によるものと考えられる。そして本酵素の場合では、NADH cyt c レダクターの場合と異なり(Fig.8)、不活性型への転換はBSAによって抑制されるものと考えられる。

### Ms結合 HMG-CoA レダクターの活性と磷脂質との関係

Fig.9で示したように、羅病組織のMs画分から抽出した磷脂質のミセルの添加によって、本酵素のプリインホーバージョンによる失活は抑制された。この結果は本酵素の正常な機能発現に磷脂質が必要であり、本酵素がいちゆる脂

質依存性酵素であることを強く示している。

## References

- 1) Katchalstki, E., Silman, I. and Goldman, R. (1971) Adv. Enzymol., 34, 445 - 536.
- 2) Racker, E. (1967) Fed. Proc., 26, 1335 - 1340.
- 3) Razin, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 265, 241 - 296.
- 4) Singer, T. P. and Gutman, M. (1971) Adv. Enzymol., 34 79 - 153.
- 5) Cerletti, P. and Zanetti, G. (1971) In Membrane-bound Enzymes, ed. by G. Porcellati and F. Jeso. pp. 161 - 173.
- 6) Silman, H. I. and Karlin, A. (1967) Pro. Natl. Acad. Sci. U. S., 58, 1664 - 1668.
- 7) Coleman, R. and Hubscher, G. (1963) Biochim. Biophys. Acta, 73, 257 - 266.
- 8) Rossi, C. R. and Cariagni, G. (1971) In Membrane-bound Enzymes, ed. by G. Porcellati and F. Jeso. pp. 147 - 159.
- 9) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A. and LeBaron, F. N. (1951) J. Biol. Chem., 191, 833 - 841.
- 10) Noda, M. and Ikegami, R. (1966) Agr. Biol. Che., 30, 330 - 337.
- 11) Allen, R. J. L. (1940) Biochem. J., 34, 858 - 865.
- 12) Suzuki, H. and Uritani, I. (1977) Plant & Cell Physiol., 18, in press.
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265 - 275.
- 14) Jones, P. D., Hollowang, P. W., Peluffo, P. O. and Wakil, S. J. (1969) J. Biol. Chem., 244, 744 - 754.
- 15) Duttera, S. M., Byrne, W. L. and Canza, M. C. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2216 - 2228.

- 16) Jones, P. D. and Wakil, S. J. (1967) J. Biol. Chem.,  
242, 5267 - 5273.
- 17) Ozaki, S., Onishi, T. and Imai, Y. (1970) Twelfth  
Proceeding of Japan Council of Biochemistry of Lipids,  
12, 1 - 5.
- 18) Friedlander, M. and Newman, J. (1968) Plant Physiol.,  
43, 1249 - 1254.
- 19) Bonner, W. D. (1967) Method Enzymol., ed. by R. W. Estabrook  
and M. E. Pullman. vol. X, pp. 126 - 133.
- 20) Earnshaw, M. J. and Truelove, B. (1970) Plant Physiol.,  
45, 322 - 326.
- 21) Broody, M. (1974) In Biomembranes: Architecture, Biogenesis,  
Bioenergetics, and Differentiation, de. by L. Packer.  
pp. 331 - 351.
- 22) Depierre, J. W. and Ernster, L. (1975) FEBS Lett.,  
55, 18 - 21.
- 23) Cater, B. R. and Hallinan, T. (1971) FEBS Lett., 16,  
137 - 140.
- 24) Rhoads, A. R. and Veitch, F. P. Jr. (1971) Biochem.  
Biophys. Res. Commun., 45, 1457 - 1465.
- 25) Cater, B. R., Trivedi, P. and Hallinan, T. (1975)  
Biochem. J., 148, 279 - 298.

Table 1. Effect of 1% (w/v) BSA on activities of HMG-CoA reductase and other membrane-bound enzymes

	+BSA <sup>a</sup>		-BSA	
	Mt	Ms	Mt	Ms
Cyt. c oxidase <sup>b</sup>	3.58 (0.71) <sup>d</sup>	1.25 (1.51)	4.98	0.83
NADH cyt. c reductase <sup>b</sup>	1.24 (0.61)	1.10 (1.10)	2.02	0.70
Anti. insens. NADH cyt. c reductase <sup>b</sup>	0.36 (0.95)	0.99 (2.48)	0.38	0.40
NADPH cyt. c reductase <sup>b</sup>	0.36 (0.95)	0.37 (0.90)	0.38	0.41
HMG-CoA reductase <sup>c</sup>	1.59 (2.09)	2.76 (2.14)	0.76	1.29

a, Mt and Ms fractions were prepared from diseased tissue in the presence of 1% (w/v) BSA during the preparations.

b, change in absorbance at 550 nm per min per g fresh weight.

c, amount (nmole) of mevalonate formed in 30 min per g fresh weight.

d, ratio of activity in the presence of BSA to that in its absence.

"antimycin A insensitive" is expressed as anti. insens.

Table 2. Removal of microsomal FFAs by BSA treatment.

FFAs	FFA contents (nmoles/mg protein)		$\frac{(A) - (B)}{(A)} \times 100(\%)$
	(A)	(B)	
PA	98.3	36.3	63.1
SA	15.8	8.6	45.3
OA	8.2	3.5	56.6
LA	35.2	20.4	42.0
LNA	4.9	3.1	45.3

PA: palmitic acid, SA: stearic acid, OA: oleic acid, LA: linoleic acid, LNA: linolenic acid. (A) and (B), FFA contents of BSA-not treated and BSA-treated Ms fractions, respectively. Ms pellets were prepared from diseased tissue in the presence and absence of 1% (w/v) BSA during the preparations, and then washed one time with suspension medium (0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.5 M sucrose, 1 mM EDTA and 1 mM DTT). Final Ms fractions are called "BSA-treated Ms" and "BSA-not treated Ms", respectively.

Table 3. Compositions of the endogenous FFAs of BSA-not treated and BSA-treated Ms fractions.

FFAs	Ms fractions	
	BSA-not treated (% of total FFA)	BSA-treated
LAA	3.8	9.8
MA	2.9	4.4
PA	54.5	43.9
POA	4.5	5.4
SA	5.8	6.8
OA	3.1	2.9
LA	21.3	22.0
LNA	1.8	2.4

LAA: lauric acid, MA: myristic acid, PA: palmitic acid, POA: palmitoleic acid, SA: stearic acid, OA: oleic acid, LA: linoleic acid, LNA: linolenic acid.



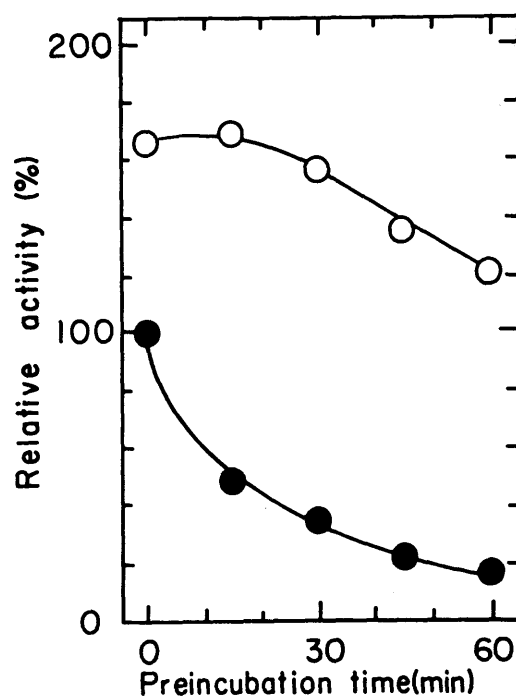


Fig. 1. Inactivation of HMG-CoA reductase during preincubation and its prevention by BSA. BSA-not treated Ms fraction was preincubated for the indicated times in the presence (O) or absence (●) of 1% (w/v) BSA, then the activity was assayed as described in Experimental Methods. Each point represents the average of two experimental data.

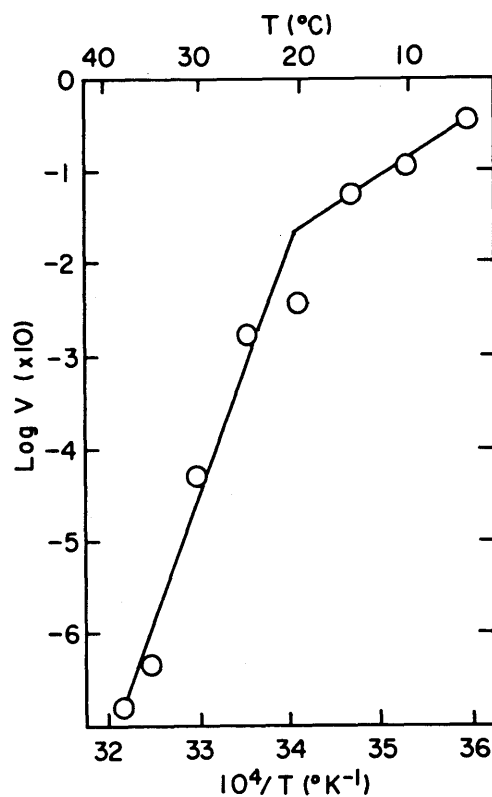


Fig. 2. Arrhenius plot for inactivation of HMG-CoA reductase during preincubation. BSA-not treated Ms fraction was preincubated at indicated temperatures for 30 min and the activity was assayed as described in Experimental Methods, then the Arrhenius plot was drawn.

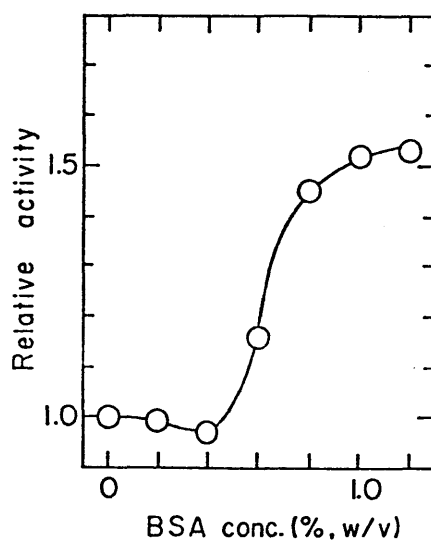


Fig. 3. BSA activation of HMG-CoA reductase as a function of BSA concentration. Ms fraction was prepared from diseased tissue. BSA was not present during the preparation. HMG-CoA reductase activity was assayed in the presence of the indicated concentrations of BSA. Relative activity: ratio of activity in the presence of BSA to that in its absence.

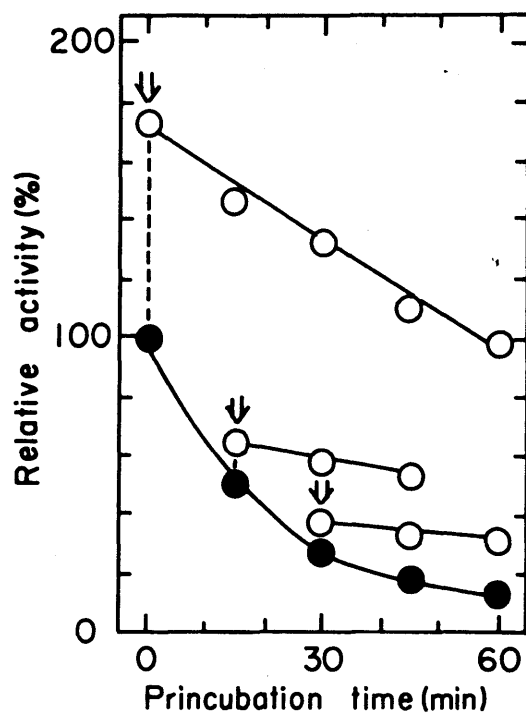


Fig. 4. Effect of BSA on inactivation of HMG-CoA reductase during preincubation. BSA-not treated Ms fraction was preincubated in the absence of BSA (●). At the arrow, 1% (w/v) BSA (final conc.) was added to the mixture and further preincubation was continued for the indicated times (○). Assay conditions were the same as described in Experimental Methods.

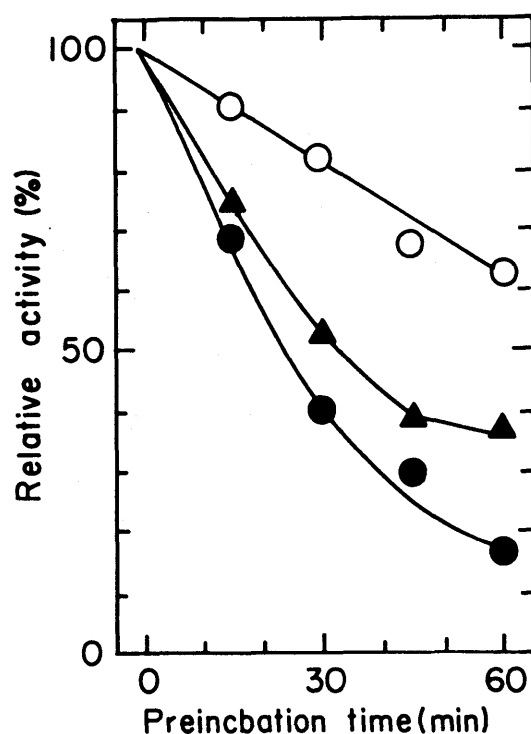


Fig. 5. Effects of NADPH and HMG-CoA on inactivation of HMG-CoA reductase during preincubation. BSA-not treated Ms (1.2 mg/ml) fraction was preincubated for the indicated times in the presence of both NADPH (8 mM) and HMG-CoA (0.7 mM) (○) and a 50  $\mu$ l portion of the mixture was used for the assay of HMG-CoA reductase, using  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA. BSA-not treated Ms fraction was preincubated for the indicated times in the presence of NADPH (8 mM, ●) or  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA (0.7 mM, ▲) and the reaction was started by adding  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA or NADP (to complete NADPH regenerating system).

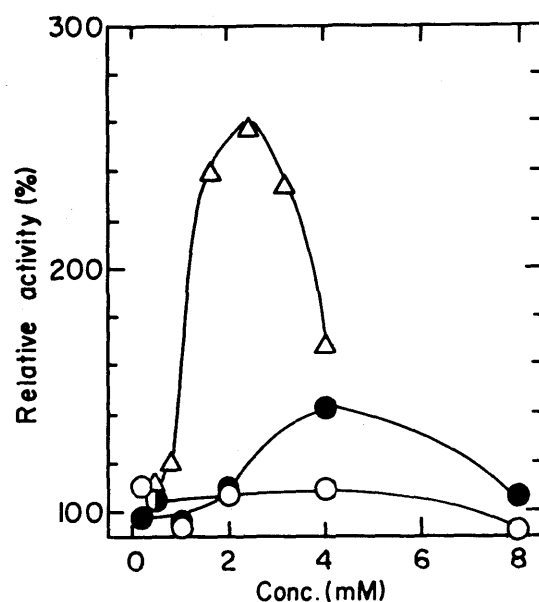


Fig. 6. Effects of exogenous FFAs and SDS on HMG-CoA reductase activity. BSA-treated Ms fraction was preincubated for 30 min in the presence of palmitic acid (PA, ○), linoleic acid (LA, ●) or SDS (Δ) to give the indicated concentration. Ten  $\mu$ l of ethanol solution containing indicated concentrations of PA or LA was added to each reaction mixture.

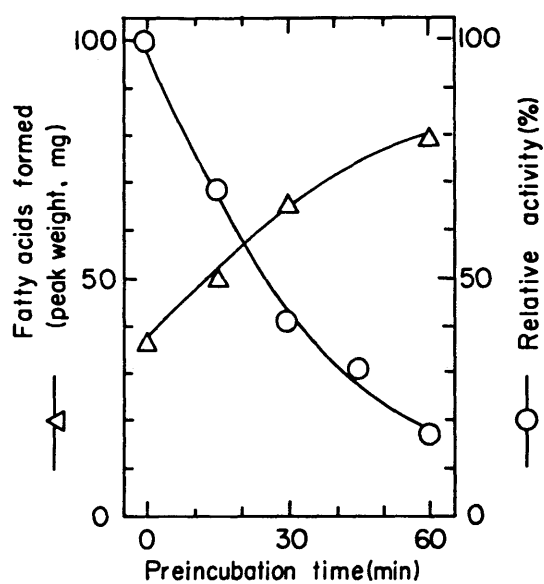


Fig. 7. Relationship between formation of fatty acids in BSA-not treated Ms fraction and inactivation of HMG-CoA reductase during preincubation. BSA-not treated Ms (3.04 mg/ml) fraction was incubated at 30°C for the indicated times and FFAs were estimated as described in Experimental Methods.

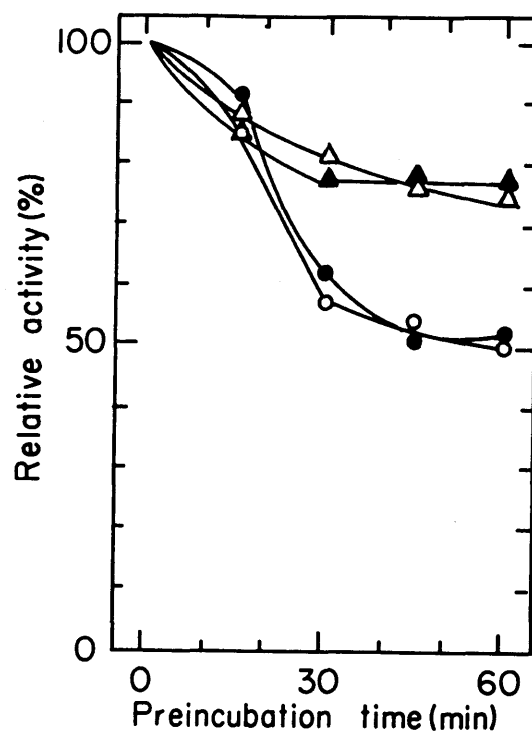


Fig. 8. Effect of BSA on inactivation of NADH cytochrome c reductase (antimycin A insensitive) and NADPH cytochrome c reductase during preincubation. BSA-not treated Ms fraction was preincubated for the indicated times in the absence or presence of 1% (w/v) BSA. O and ●, antimycin A insensitive NADH cyt. c reductase activity in the absence and presence of BSA, respectively. Δ and ▲, NADPH cyt. c reductase activity in the absence and presence of BSA, respectively.



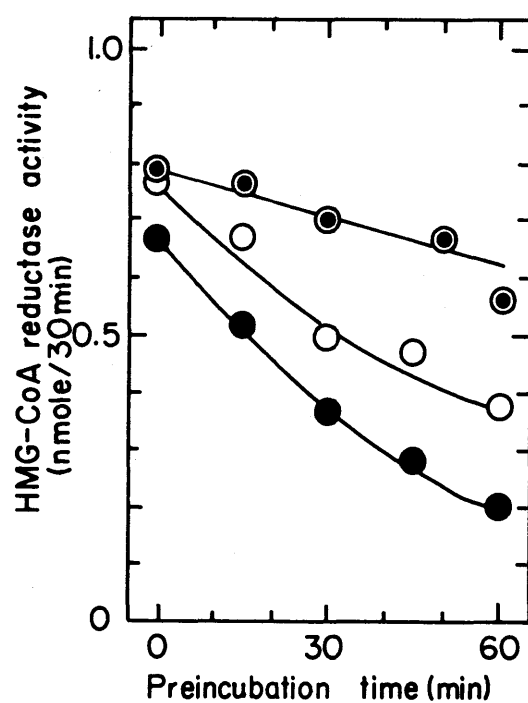


Fig. 9. Effects of phospholipids plus BSA (◐) and BSA alone (○) on activity of HMG-CoA reductase of BSA-treated Ms fraction in comparison with that of the control (without any addition, ●). Each tube contained 0.25 mg of Ms protein with 1.41 mg of phospholipids from BSA-treated Ms fraction and 0.1% (w/v) BSA or BSA alone.

### 第三章 ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクター ゼの可溶化, 部分精製並びにその 酵素学的性質

#### 緒言

細胞内では代謝地図で示されているような複雑多岐な化学反応連鎖が, 酵素によって円滑に, 調節を受けつつ, また秩序正しく進められている。そしてその代謝の調節を支配している要因は多種多様であるが, 終局的には酵素量, 酵素活性あるいはその両者を変動させることによって行われていると云ってよい。更に代謝調節の重要な因子として酵素の組織化があげられる。この酵素の組織化は代謝の方向を決める大きな要因ともなり得る。例えば, Tolbert 等(1)によつて示されたクロロプラスト, ヤルオキシゾーム及びMtの協同によるグリコール酸代謝, Mtにおける電子伝達反応及びMsにおける薬物代謝(水酸化)(2, 3)や脂肪酸不飽和化(4-6)などは酵素の組織化がこれらの代

謝においていかに重要な要素になっているかを示している。

HMG-CoAレダクターゼに関して言えば、これを經由して、諸論の Fig. 1 で示したような多くの生理的に重要な機能をもっているイソプレノイドが合成されるが、この生合成系は植物の分化と発育の過程で、また環境の変化に対応して、高度に調節されていなければならないであろう。すなわち細胞は環境適応として、何を合成する必要があるのかという代謝の方向を決定する。例えば、感染という環境の変化に応答適応してサツマイモ塊根組織細胞は Ms において、HMG-CoAレダクターゼの活性を増大させ、抗菌性の Ip を主体としたフラノテルペン類を合成し、蓄積し、菌の侵入を阻止する。また第一章で述べたように、Mt に局在する HMG-CoAレダクターゼは Mt における電子伝達系の構成成分であるコエンザイム Q の合成に関与するものと推定される。このような酵素の組織化(あるいは区画化)によって初めて高度に

調節され得るイソプレノイドの合成が可能となるのであろう。従って、これらのことは酵素の細胞内の存在様式、特に膜との関連で極めて重要な問題として着目する必要がある。Ms結合 HMG-CoA レダクターゼに関して言えば、その前後に位置する酵素(HMG-CoA シンターゼ及び MVA キナーゼ)は細胞質に可溶性酵素として存在している可能性が強く、本酵素のみがMsに膜酵素として存在する理由とか、更に、このことがフラノテルペン類の生合成の代謝調節においても意義を含めて、解決しなければならぬ問題を提起する。

以上のような観点から、本実験はMs結合 HMG-CoA レダクターゼに着目して、これをMs膜から可溶化、部分精製した場合と、結合している場合の両者の酵素学的性質を比較することによって本酵素の機能にMs膜がいかなる関与をしているのかを解析することを目的として行った。

## 実験方法

### 実験材料及びミクロゾーム画分の調製

実験材料は第一章で述べた罹病組織の被害部隣接縁全部を用いた。またMs画分の調製は1%(w/v)牛血清アルブミン(BSA)の存在で行われた以外は第二章で述べた通りである。

### HMG-CoA レダクターゼの活性測定

本酵素の活性は第一章で述べた方法で測定した。

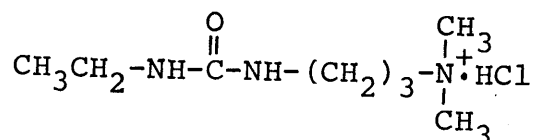
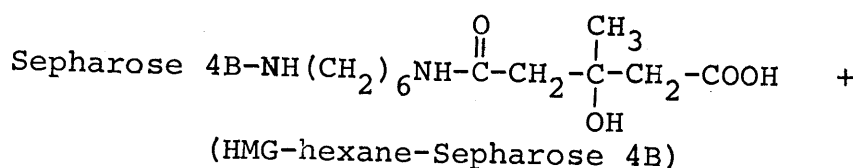
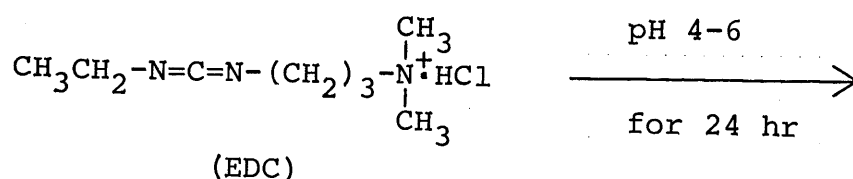
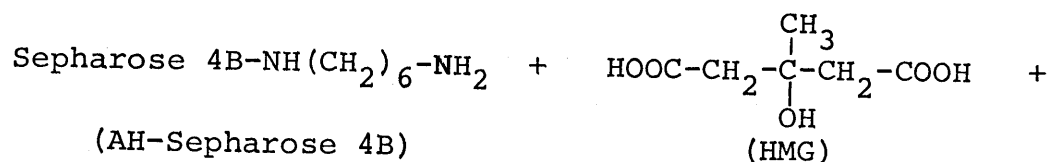
### HMG-CoA レダクターゼのミクロゾーム膜からの可溶化並びに部分精製

#### 1) 可溶化

調製したMs画分を蛋白質濃度が1-2mg/mlになるようにsuspension medium (0.05M 磷酸緩衝液, pH7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 20%(w/v) グリセロール)で希釈した後、最終濃度が1%(v/v)になるように10%(v/v) Triton X-100 溶液を加えて十分に攪拌した。この懸濁液を140,000xg で1時間遠心して得られた上清を可溶化したHMG-CoA レダクターゼの粗酵素液とした。

## 2) HMG-hexane-Sepharose 4B の調製

乾燥粉末 3.75g の AH-Sepharose 4B (CNBr で活性化した Sepharose 4B に 1,6-ジアミノヘキサンを共有結合させたもの) を 0.5N NaCl (1500ml) で洗淨, 膨潤させた後, 蒸留水 (500ml) で洗淨した。リガンドである HMG (170.1mg, 1.05mmole) とビカッソーニング試薬の EDC [1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, 402.2mg, 2.1mmole] をそれぞれ, 蒸留水に溶かし, pH を 4.0-6.0 に調整した。両溶液を AH-Sepharose 4B ゲル懸濁液と混ぜ, 室温で 24 時間反応させた。反応開始後, 1-2 時間以内での pH 変動は大きいので常に pH が 4-6 になるように補正した。反応終了後, 0.5N NaCl (500ml), 次に蒸留水 (500ml) で過剰の HMG, 未反応の EDC や尿素誘導体を洗い流した。以上のようにして調製した HMG-hexane-Sepharose 4B を HMG-GAL タクティの精製に使用した。なお, HMG-hexane-Sepharose 4B が生ずる反応を以下に示した。



### 3) 精製

可溶化した粗酵素液中に含まれている Triton X-100 の濃度 (1%, v/v) を 0.1% (v/v) に下げするため, この粗酵素液 (約 30ml) を elution buffer [0.05M 磷酸緩衝液, pH 7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% (v/v) Triton X-100, 20% (w/v) グリセロール] で平衡化した Sephadex G-25 (2.5 x 35 cm) に通して得られた蛋白質画分を, 直ちに elution buffer で平衡化した DE-52 (2.5 x 12 cm) あるいは HMG-hexane-Sephacrose 4B (1.5 x 5 cm) のカラムに添加し, 吸着しなかった蛋白質を elution buffer で洗浄後, 吸着した蛋白質を DE-52 の場

合には 0.5M KCl (elution buffer に溶解) また HMA-hexane-Sepharose 4B の場合には 2.0M KCl (elution buffer に溶解) でそれぞれ溶出した。溶出液は 2ml づつ分取した。

### 脂質ミセルの調製

シグマ社から購入したホスファチジルコリン (PC, 1ml の  $n$ -hexane に 0.1g の PC を含む) とホスファチジリエタノールアミン (PE, 固体) の一定量を取り, PE の場合は  $n$ -hexane に溶かした後, これらに窒素ガスを吹きつけて溶媒を完全にとばした。次に 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.5) 1ml に懸濁し, これを 0°C において音波処理<sup>(20 kHz, 15秒, 4回)</sup>したものを PC 及び PE の脂質ミセルとして使用した。

### 蛋白質濃度の定量

蛋白質濃度の定量は, 酵素液中に Triton X-100 が含まれており, これが Lowry 法(?) による定量に影響を与えるため, Lowry 法を改良した Wang と Smith (8) の方法に従って行った。酵素液 (50-100  $\mu$ l) に 20% (w/v) トリクロロ酢酸 (1ml) を加え, 遠心により蛋白質を沈殿させた後, 上清を注



意深く除去した。沈殿した蛋白質を 1N NaOH (1ml) で溶解し, その 0.1ml を取り, これに 2% 炭酸ナトリウム—10% SDS—1% クエン酸ナトリウムを含む 0.5% 硫酸銅(47.5:2.5:1) を 1ml 加えて十分に混合した。10分後に Folin-Ciocalteu フェール試薬を 0.1ml 加え,十分に混合した後, 25°C で 30分間, 発色させ, 750nm で吸光度を測定した。

### 実験結果

#### ミクロゾーム結合 HMG-GA レダクターゼの可溶化

Fig.1 とび 2 はそれぞれ非イオン性界面活性剤である Triton X-100 とび陰イオン性界面活性剤の sodium deoxycholate (DOC) の濃度による HMG-GA レダクターゼと蛋白質の可溶化率(%)を示したものである。これによると蛋白質の可溶化率は両者共に大きな差はなく, これらの濃度の増大と伴に, その可溶化率は増大した。一方, 本酵素の可溶化率は Triton X-100 による方が良く, 1%(v/v) で最大であった。次に異なる hydrophilic

lipophilic balance (HLB)値を持つ非イオン性界面活性剤<sup>(1%, v/v)</sup>による本酵素の可溶化率を調べたところ、HLB値が13.5であるTriton X-100が最大の可溶化率を示した(Fig. 3)。界面活性剤以外の方法による可溶化をも試みたが(Table 1), Triton X-100による方法より有効と考えられる方法は見出されなかった。Fig. 4は1%(v/v) Triton X-100による本酵素の可溶化率に及ぼすMs蛋白質の濃度の影響を示している。これによると、可溶化率は蛋白質濃度が1-2mg/mlの時に最も良かった。更に1%(v/v) Triton X-100による本酵素の可溶化率に及ぼすヨ糖やグリセロールの影響を調べたところ(Table 2), これらの存在によって、見かけ上の可溶化率は高められてはいるが、これはヨ糖あるいはグリセロールが可溶化されたHMG-CoAレダクターゼの安定化に寄与していることによるものと考えられよう。

以上の結果から、Msからの本酵素の可溶化はMs蛋白質の濃度が1-2mg/mlになるように調製し、20%(w/v)グリセロールの存在のもとで、1%

(v/v) Triton X-100 で行うことにした。

### HMG-CoA レダクターゼの部分精製

可溶化された HMG-CoA レダクターゼの粗酵素液に対し、DE-52 セルロースクロマトグラフィーあるいは HMG-hexane-Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーを行った結果を Fig. 5 と 6 にそれぞれ示した。その結果、ほぼ同程度の比活性の標品が得られた。アフィニティークロマトグラフィーでは 2.0 M KCl で溶出される画分に本酵素活性が見出されたが、蛋白質のピークと本酵素活性のそれとは必ずしも一致しなかった。このことは、溶出と同時に、UV モニター (280 nm) で記録させた蛋白質の溶出ピーク I, II, III (Fig. 7) のうちピーク III が本酵素活性に対応するものと考えられ、II, III を含む画分を採ったので、アフィニティークロマトグラフィーによって得られた本酵素液中にはかなりの不純蛋白質が含まれていることを示している。このようにして得られた本酵素液は約 17 倍に精製され、更に活性収量は 46% で高かった (Table 3)。ただし、これは Triton X-100 の存在による活性化にもとづ

く値も入っている。

本実験ではアフィニティー クロマトグラフィー で部分精製した HMG-CoA レダクターゼを使用した。

### HMG-CoA レダクターゼの磷脂質依存性

第二章で述べたように、 $M_s$  に結合した本酵素の安定性には磷脂質が関与しており、本酵素が磷脂質依存性であることを示唆した。本章ではこれを実証するため、可溶化後、部分精製した本酵素の活性に対するホスファチジルコリン(PC)とホスファチジリエタノールアミン(PE) [PCとPEは高等植物細胞の $M_s$ 中に含まれる主な磷脂質である(9-12)] の影響を調べた(Fig. 8)。これによると酵素蛋白質の濃度の3-5倍量のPCにより約2倍に、また5-7倍量のPEにより約1.5倍に活性化された。しかし、これらの濃度を更に高めると活性化はむしろ低下した。このようにPCやPEによって本酵素活性が高められることは本酵素が磷脂質依存性であることを示している。然し、PCやPEがない場合にも活性があり、これは酵素反応液中に存在する

Triton X-100(約 0.04%, V/V) による可能性がある。

更に、本酵素が Ms 膜中の磷脂質と相互作用をしていることは、その活性に対する Arrhenius プロットが 8, 17 及び 30°C 付近で折れ曲がる (Fig. 9) ことから示され得る。

### 可溶化後、部分精製した HMG-CoA レダクターゼ 活性への BSA 及びポリインキュベーションの影響

第二章で述べたように、Ms 結合 HMG-CoA レダクターゼは 30°C でのポリインキュベーションによって急激な失活をみる (第二章, Fig. 1) が、可溶化し、部分精製した本酵素の場合には、このポリインキュベーションによる失活は認められず、著しく安定であった (Fig. 10)。また 0.6-0.8% (w/v) の BSA は Ms 結合 HMG-CoA レダクターゼ及び部分精製した本酵素の両者の活性を高めた。しかし、部分精製した酵素の方は 1% (w/v) 以上の BSA により、それほど活性化されなかった (Fig. 11)。

### 可溶化後、部分精製した HMG-CoA レダクターゼ の基質に対する $K_m$ 値

Fig. 12 及び 13 で示されているように、本酵素

を可溶化後、部分精製することによって  $\Delta$ -HMG-CoA 及び NADPH に対する  $K_m$  値が両者共に著しく増大することがわかった。これらのデータから求められた  $K_m$  値を Table 4 に要約した。また、BSA なしに調製した Ms (BSA-not treated Ms) に結合している本酵素は HMG-CoA に対し負の協同性 (negative cooperativity) 及び基質阻害を示したが、BSA の存在のもとに調製した Ms (BSA-treated Ms) に結合している本酵素、更にこれから可溶化し、部分精製したものは上記の二つの性質を示さなかった [第一章, Fig. 1(b) 及び本章, Fig. 12 参照]。

## 考察

酵素が膜に存在し、組織化されることによって、代謝系全体に対して 1) 代謝効率の増大, 2) 基質の膜透過性による代謝速度の制御, 3) 疎水性基質の反応の場の提供 (例えば, 脂質代謝) という有利性を与えることはよく知られた事実である。最近では、膜脂質あるいは他の

膜蛋白質分子が膜結合性酵素の機能に重要な役割を果たしていることも明らかになっている。例えば、膜酵素分子のコンホメーションを至適な状態に保つために膜脂質を必要とする脂質依存性酵素(13)が多く見出されていることや、またアロトピー(14)なる現象、すなわち膜酵素を可溶化することによって阻害剤に対する感受性(14-18)、低温感受性(14, 15)、至適pH(19, 20)、 $K_m$ (19)、安定性(17, 21)、基質特異性(22)などの性質が変化することなどがわかってきている。

フラノテルペン類の合成系において、本酵素の前後の酵素(HMG-CoAシンターゼ、MVAキナーゼ)が細胞質に存在すると考えられるのに、本酵素のみが $M_s$ 膜に存在するという生理学的意義を上記の観点から考察する。

$M_t$ や $M_s$ における電子伝達系の一連の構成成分が膜に組織化されていることの意義は前述した3つの有利性を代謝系に与えるということによって十分説明できる。しかし、フラノテルペン類の生合成系において、本酵素が $M_s$

膜に結合している意義を前述の三点によつて十分に説明し得るとは考えられないが、本酵素の前後の酵素(HMG-CoAシンテターゼ, MVAキナーゼ)とMs膜との相互作用,あるいはHMG-CoAやMVAに対する担体蛋白質の存在の有無,そして本酵素のMs膜内での配向(orientation)等の解析がなされれば明らかになると思われる。

筆者はここで本酵素が膜に存在する意義を他の膜成分(特に脂質)による本酵素自体の機能の調節という点で説明する。

第二章及び本章で述べたように、本酵素は脂質依存性であり、特にその活性にPCが必要であるらしい(Fig. 8)。一般的に言つて、コリン含有磷脂質は膜の外側面に多く局在し、アミノ基を有する磷脂質は内側面に多い(23)ことから本酵素はMs膜の外側に位置すると考えられよう。すなわち、一種の表面性蛋白質であることがうかがえる。本酵素が脂質依存性であることは膜脂質が酵素機能の調節に何らかの役割を果たしていると考えることができる。



また Ms 結合性の本酵素活性に対する Arrhenius  $7^{\circ}$  Plott が少なくとも  $17$  と  $30^{\circ}\text{C}$  付近で折れ曲がることを示した (Fig. 9) が, これは温度による膜の流動性の変化が本酵素のコンホメーション変化を誘起することを示しており, 少なくとも 2 つの異なるコンホメーションを取り得ることが推定される。これも膜脂質との相互作用の反映とみてよからう。BSA-not treated Ms 及び BSA-treated Ms に結合した HMG-CoA レダクターゼ及び可溶化後, 部分精製した本酵素の HMG-CoA 及び NADPH に対する  $K_m$  は著しい差がみられ (Fig. 12, 13 及び Table 4), 精製することによって, HMG-CoA 及び NADPH に対し, それぞれ約 16 及び 10 倍に増大した。この事実は本酵素が Ms 膜に存在することによって両基質に対する親和性が著しく高められることを示している。また可溶化後, 部分精製した本酵素は安定であった (Fig. 10)。以上のことから, 本酵素は膜脂質との相互作用の仕方によって, Ms 膜中で少なくとも 2 つの異なる存在状態を取り得るものと

推定される。

本酵素の機能は著しく膜脂質に依存しているものと考えられ、膜脂質は本酵素の調節因子として、あるいは特異的な膜脂質の環境が本酵素の機能上の発現に必要であると推定される。本酵素は膜脂質との相互作用の仕方によって異なる動力学的パラメーターを持つコンホメーションをとることができるのであろう。このことから本酵素が膜に存在することによって、初めてその機能の多様性、あるいは環境に対するより高い適応性を獲得することができるのではなからうか。従って、このような機能の多様性、適応性の獲得を、代謝系の流れを動的に調節する有効な手段(機構)として考えることができるだろう。この機構がフラノテルペン類の生合成系全体の代謝調節にいかなる役割を果たしているのかは今後の解析を待たなければならぬ。

## References

- 1) Tolbert, N. E., Oester, A., Yamazaki, R. K., Hegeman, R. H. and Kisaki, T. (1969) *Plant Physiol.*, 44, 135 - 147.
- 2) Lu, A. Y. H. and Levin, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 344, 205 - 240.
- 3) Lu, A. Y. H. (1976) *Fed. Proc.*, 35, 2460 - 2463.
- 4) Archakov, A. I., Devichensky, V. M. and Karjakin, A. V. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, 166, 295 - 307.
- 5) Archakov, A. I., Devichensky, V. M., Karuzina, I. I. and Karjakin, A. V. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, 166, 308 - 312.
- 6) Archakov, A. I. and Devichensky, V. M. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, 166, 313 - 317.
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265 - 275.
- 8) Wang, C. H. and Smith, R. L. (1975) *Anal. Biochem.*, 63, 414 - 417.
- 9) Abdelkader, B. A. and Mazliak, P. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 15, 250 - 262.
- 10) Donaldson, R. P., Tolbert, N. E. and Schnarrenberger, C. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 152, 199 - 215.
- 11) Mackender, R. O. and Leech, R. M. (1974) *Plant Physiol.*, 53, 496 - 502.
- 12) Philipp, E., Franke, W. W., Keenan, T. W., Stadler, J. and Jarasch, E. (1976) *J. Cell Biol.*, 68, 11 - 29.
- 13) Coleman, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 1 - 30.

- 14) Racker, E. (1967) Fed. Proc., 26, 1335 - 1340.
- 15) Razin, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 265, 241 - 296.
- 16) Singer, T. P. and Gutman, M. (1971) Adv. Enzymol., 34, 79 - 153.
- 17) Cerletti, P. and Zanetti, G. (1971) In Membrane-bound Enzymes. ed. by G. Porcellati and F. Jeso. pp. 161 - 173.
- 18) Fessenden-Raden, J. M. and Racker, E. (1971) In Structure and Function of Biological Membranes, ed. by L. I. Rothfield. pp. 401 - 440.
- 19) Katchalski, E., Silman, I. and Goldman, R. (1971) Adv. Enzymol., 34, 445 - 536.
- 20) Silman, H. I. and Karlin, A. (1967) Pro. Natl. Acad. Sci. U. S., 58, 1664 - 1668.
- 21) Coleman, R. and Hubscher, G. (1963) Biochim. Biophys. Acta, 73, 257 - 266.
- 22) Rossi, C. R. and Cariagni, G. (1971) In Membrane-bound Enzymes, ed. by G. Porcellati and F. Jeso. pp. 147 -159.
- 23) Verkleij, A. J., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijin, D. and Van Deenen, L. L. M. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 323, 178 - 193.

Table 1. Percent solubilization of HMG-CoA reductase and microsomal protein from microsomal fraction by various treatments.

Treatments	Ms protein (mg/ml)	Percent solubilization		
		Activity	Protein	
KCl				
2.0M	1.83	8.9	6.6	
	4.50	29.4	7.0	
3.0M	1.83	24.1	11.6	
	4.50	30.0	11.1	
Sonic oscillation <sup>a</sup>				
40sec.	2.25	18.3	20.3	
80sec.	1.83	17.7	22.9	
	2.25	28.8	21.5	
120sec.	1.83	27.6	17.2	
	2.25	39.0	31.2	
Sonic oscillation + KCl				
80sec. + 2.0M	2.87	27.6	20.5	
80sec. + 3.0M	2.87	28.3	18.1	
Sonic oscillation + Triton X-100				
80sec. + 0.5%(v/v)	1.80	49.2	40.5	
80sec. + 1.0%(v/v)	1.80	61.7	52.5	
Freezing and thawing <sup>b</sup>				
1 times	2.54	2.3	11.0	
2 times	2.54	0.3	8.8	
3 times	2.54	0	8.9	

a, sonic oscillations were performed at 20 kHz for 20 sec.- intervals.

b, Ms pellets were frozen in a dry ice-alcohol bath and then thawed at 4°C. This treatment was repeated indicated times.

Table 2. Effect of sucrose and glycerol on solubilization of HMG-CoA reductase from microsomal fraction by 1% (v/v) Triton X-100.

Additions	Total activity (nmole/30min)		Percent solubilization
	Supernatant <sup>in</sup>	Pellet	
No	1.63	0.89	64.7
20% (w/v) sucrose	3.95	0.79	83.5
20% (w/v) glycerol	4.92	1.18	80.7

Table 3. Summary of partial purification of HMG-CoA reductase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (nmole/30min)	Recovery (%)	Specific activity (nmole/30min/mg)	Purification (-fold)
Ms suspension <sup>a</sup>	25.5	5.6	100	0.22	1
Triton X-100 solubilization <sup>b</sup>	17.4	17.6	314	1.01	4.6
Affinity chromatography <sup>c,d</sup>	0.7	2.6	46	3.71	16.9

a, b and c, assays were performed in the absence (a) and presence (final concentrations; 0.4% (b), 0.04% (c)) of Triton X-100, respectively.

d, fractions were collected from 29 to 33 in fraction number in Fig. 6 (total volume, 10 ml).

Table 4. Comparison of Km values for S-HMG-CoA and NADPH between microsomal and partially purified HMG-CoA reductase.

	Microsomal HMG-CoA reductase from		Partially purified HMG-CoA reductase
	BSA-not treated Ms	BSA-treated Ms	
Km for			
<u>S</u> -HMG-CoA ( $\mu$ M)	6.5, 21 <sup>a</sup>	11	171
NADPH (mM)	————	0.44	4.6

a (BSA-not treated Ms enzyme), cited from the data shown in Fig. 1.  
of Chapter I.

The BSA-treated Ms enzyme and partially purified enzyme were the  
same as shown in the legend to Fig. 10.



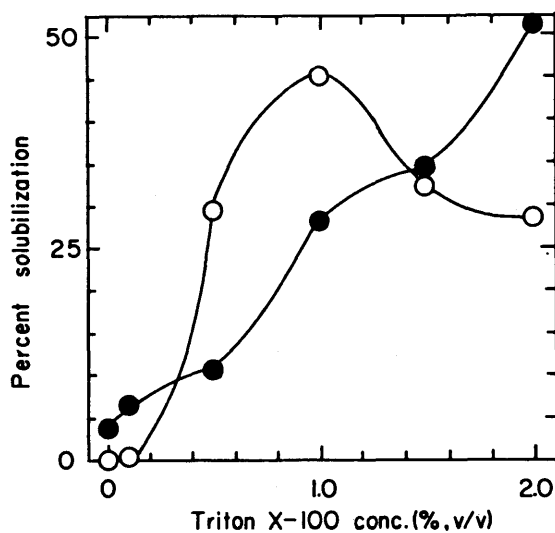


Fig. 1. Percent solubilization of HMG-CoA reductase and microosomal protein from microosomal (2.47 mg protein) fraction by various concentrations of Triton X-100. Points at the left end of graph are control values (no detergent).  
 ○ — ○ , solubilized HMG-CoA reductase; ● — ● , solubilized microosomal protein.

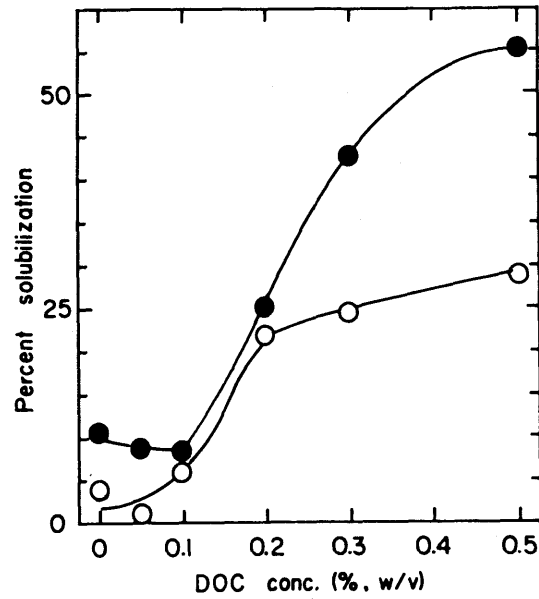


Fig. 2. Percent solubilization of HMG-CoA reductase and microsomal protein from microsomal (1.80 mg protein) fraction by various concentrations of deoxycholate. Points at the left end of graph are control values (no detergent). O — O , solubilized HMG-CoA reductase; ● — ● , solubilized microsomal protein.

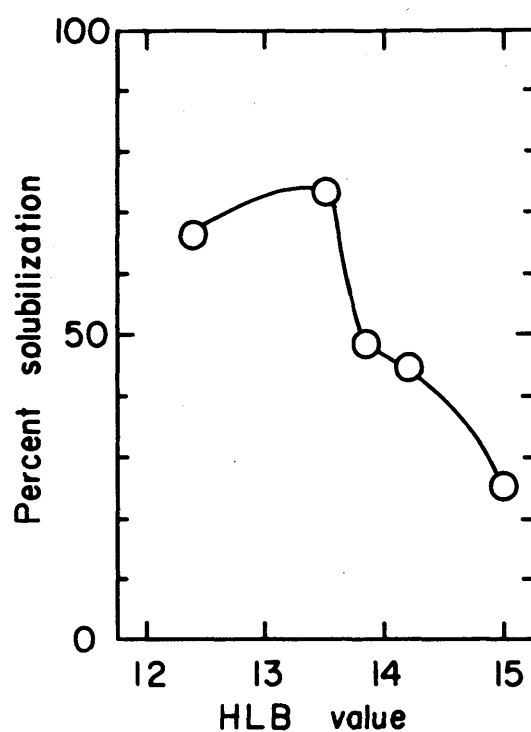


Fig. 3. Percent solubilization of HMG-CoA reductase from microsomal fraction by various detergents with different HLB values. Experimental conditions are as described in Experimental Methods. Detergents used were Emulgen 108, Triton X-100, Lubrol Px, Emulgen 220 and Tween 80, for which HLB values are 12.4, 13.5, 13.8, 14.2 and 15.0, respectively. Concentration of each detergent was 1% (v/v).

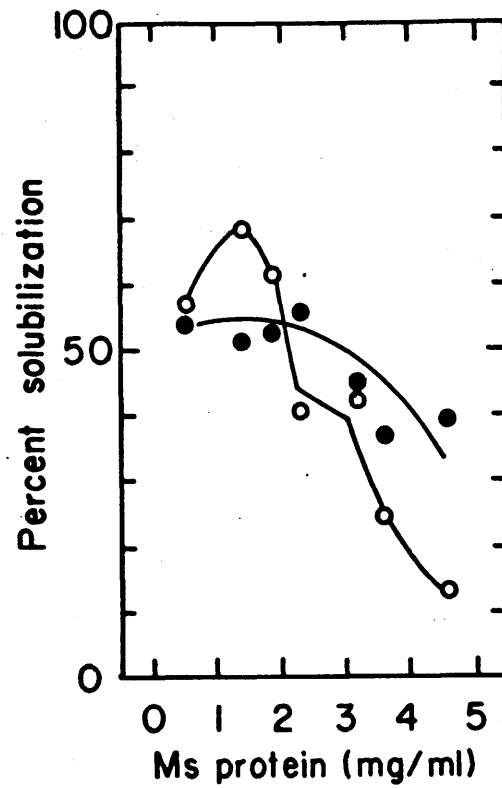


Fig. 4. Percent solubilization of HMG-CoA reductase and microosomal protein from microosomal fraction at various microosomal protein concentrations by 1% (v/v) Triton X-100.

○ — ○ , solubilized HMG-CoA reductase; ● — ● , solubilized microosomal protein.

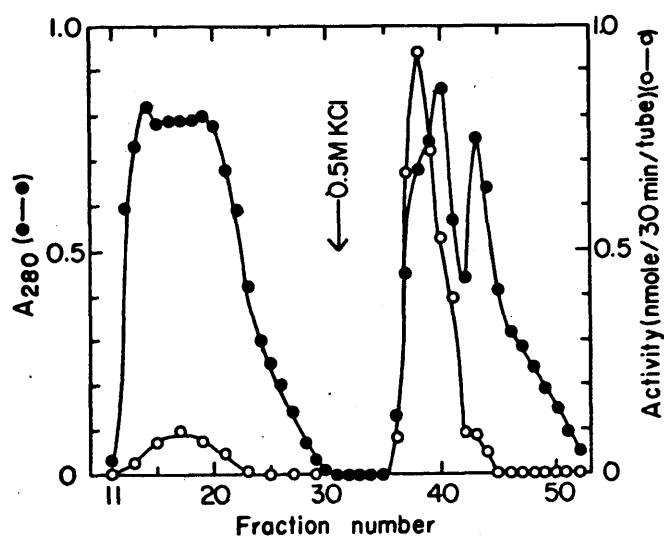


Fig. 5. Elution profile of HMG-CoA reductase solubilized by Triton X-100 on DE-52 cellulose column. Solubilized HMG-CoA reductase was applied to a 2.5 x 12 cm column (20 ml of gel) of DE-52 cellulose at 4°C. The column was previously equilibrated with 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 20% (w/v) glycerol. Nonadsorbed protein was washed from the column with the same buffer. The enzyme was eluted with that buffer containing 0.5 M KCl. The rate of elution was 2.0 ml/min. Two-milliliter fractions were collected. ○ — ○ , activity of HMG-CoA reductase (nmole mevalonate formed per 30 min per tube); ● — ● , absorbance at 280 nm.

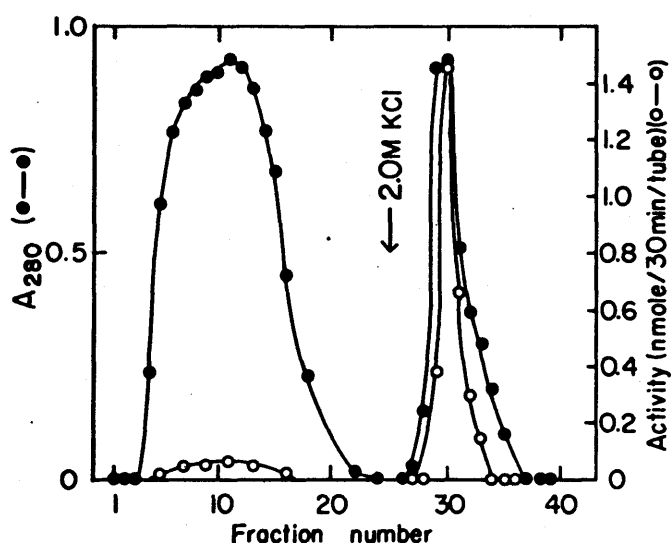


Fig. 6. Elution profile of HMG-CoA reductase solubilized by Triton X-100 on HMG-hexane-Sepharose 4B column. Solubilized reductase was applied to 1.5 x 5 cm column (5 ml of gel) of HMG-hexane-Sepharose 4B at 4°C. The column was previously equilibrated with 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 20% (w/v) glycerol. Nonadsorbed protein was washed from the column with the same buffer. The enzyme was eluted with that buffer containing 2.0 M KCl. The rate of elution was 1.2 ml/min. Two-milliliter fractions were collected. ○ — ○ , activity of HMG-CoA reductase (nmole mevalonate formed per 30 min per tube); ● — ● , absorbance at 280 nm.

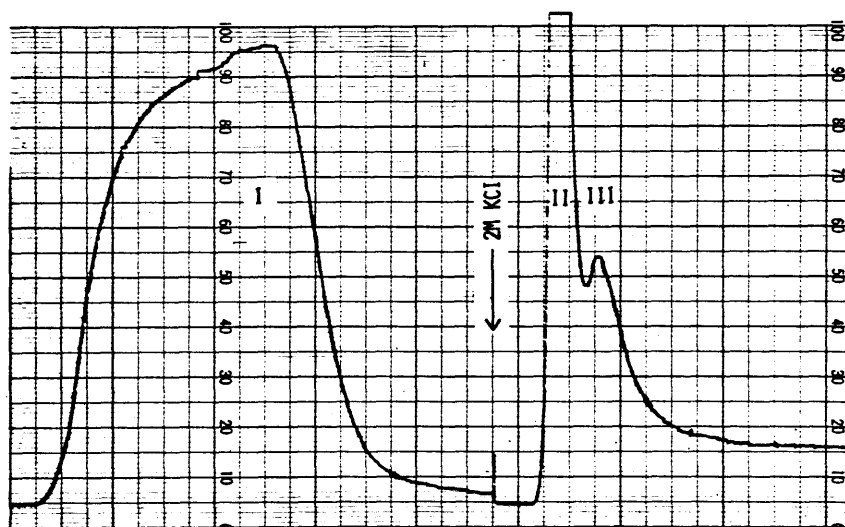


Fig. 7. Protein elution pattern of HMG-hexane-Sepharose 4B affinity chromatography assayed by UV monitor (at 280 nm).

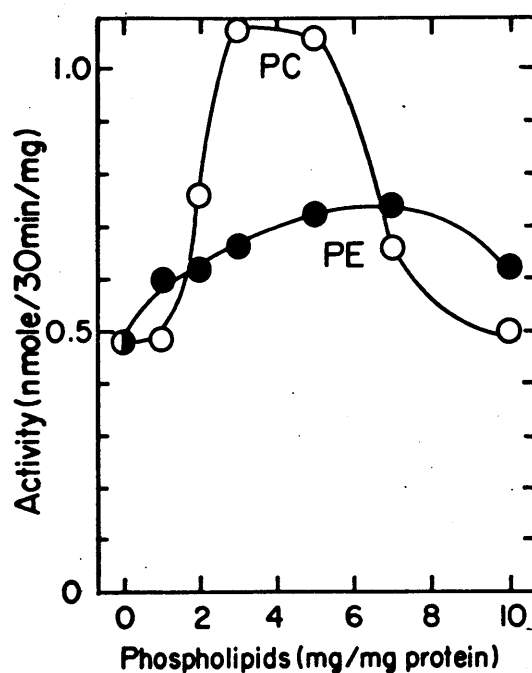


Fig. 8. Effects of phospholipids on the activity of partially purified HMG-CoA reductase. Indicated amounts of phosphatidyl choline (PC) or phosphatidyl ethanolamine (PE) were added to reaction mixtures containing HMG-hexane-Sepharose 4B-purified HMG-CoA reductase (0.05 mg/250  $\mu$ l). After 30 min at 0°C, enzyme assays were performed as described in Experimental Methods.



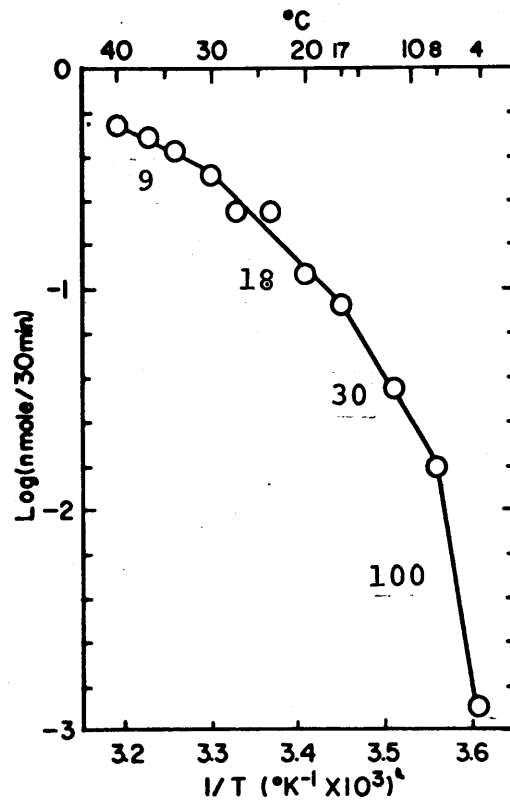


Fig. 9. Arrhenius plot of microsomal HMG-CoA reductase from diseased tissue. BSA-treated Ms were used as enzyme source of membrane-bound HMG-CoA reductase. BSA-treated Ms were prepared in the presence of 1% (w/v) BSA, as shown in Chapter II (Table 2). The number beside the line shows the activation energy in Kcal/mole calculated from the slop of the line.

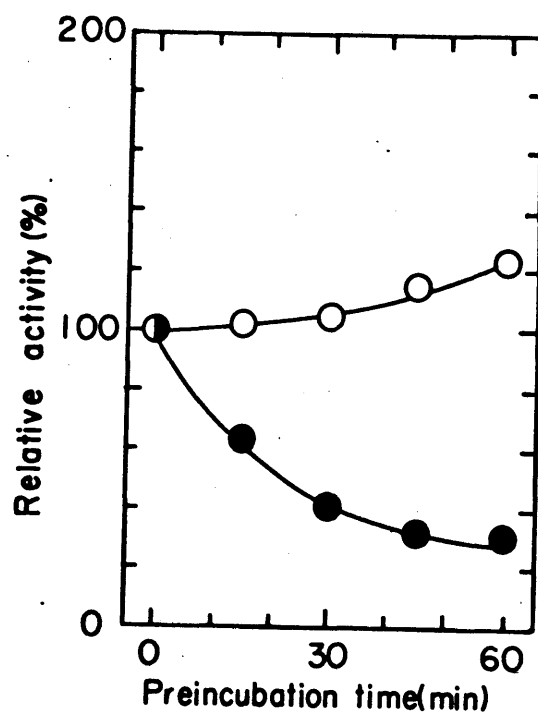


Fig. 10. Effect of preincubation at 30°C on activities of microsomal (●) and partially purified (O) HMG-CoA reductase. The microsomal enzyme from BSA-treated Ms and partially purified enzyme were prepared according to Experimental Methods shown in Chapter II (Table 2) and III, respectively.

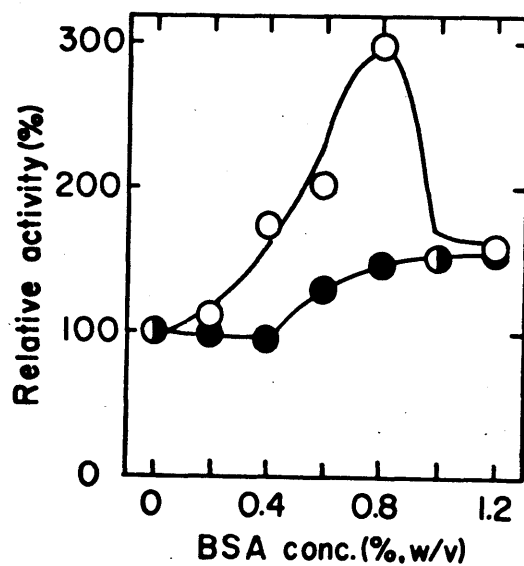


Fig. 11. Effect of BSA on activities of microsomal (●) and partially purified (○) HMG-CoA reductase. The enzyme sources were the same as shown in the legend to Fig. 10.

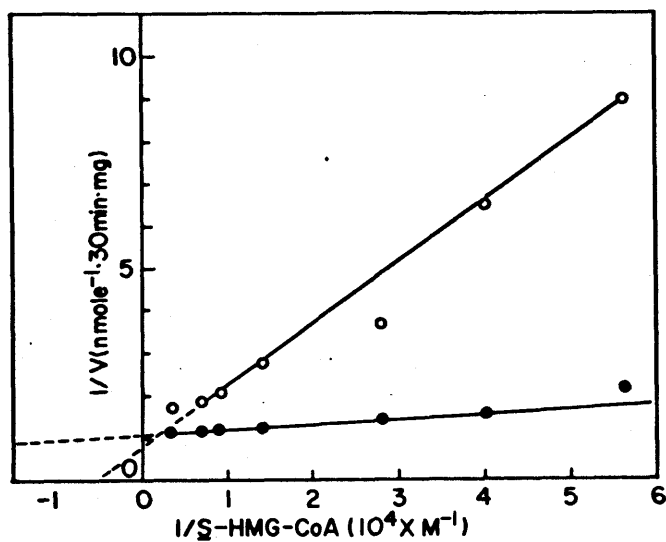


Fig. 12. Lineweaver-Burk plots of microsomal (●) and partially purified (○) HMG-CoA reductase as a function of the concentration of  $S$ -HMG-CoA. The enzyme sources were the same as shown in the legend to Fig. 10.

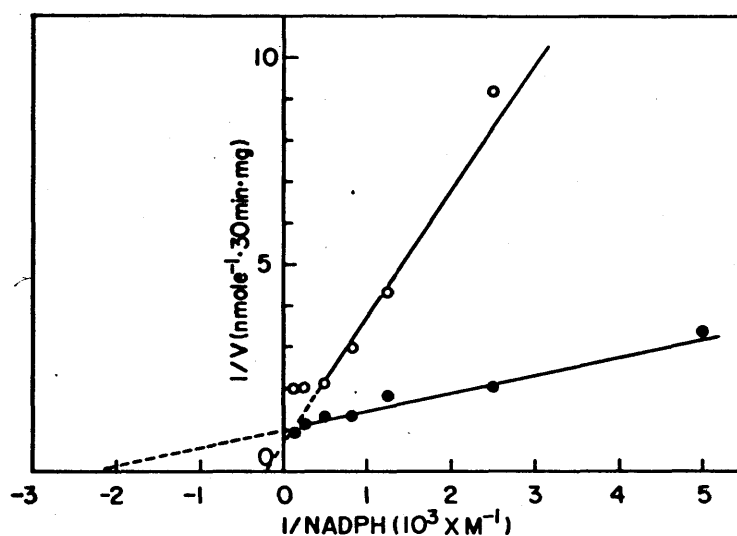


Fig. 13. Lineweaver-Burk plots of microsome (●) and partially purified (○) HMG-CoA reductase as a function of the concentration of NADPH. The enzyme sources were the same as shown in the legend to Fig. 10.

## 要約

高等植物は種々のイソプレノイドを合成することができ、そして、その多くは高等植物の生長、発育また生命の維持に不可欠のものである。例えば、植物ホルモンとしてのチトキニン、ジベレリン、アブサイシン酸、ミトコンドリアやクロロプラストの電子伝達系の構成成分としてのユビキノン(コエンザイム<sub>Q</sub>)やプラストキノン、光合成色素であるクロロフィルの部分を作るフィトール、膜構成成分として考えられているステロール類、そして病原性微生物の感染によって初めて生成する抗菌性物質としてのテルペン類などがそれである。これらのイソプレノイドの生合成の主な経路はおおよそ明らかにされているにもかかわらず、その酵素レベルでの代謝調節に関する研究はその緒についた段階であり、特に HMG-CoA からメバロン酸の合成に関与する酵素は検出されていなかった。本研究においては動物でコレ

ステロール生合成の律速酵素として明らかにされている HMG-CoA レダクターゼに着目し、この酵素学的諸性質を解析するとともにテルペン類の代謝調節の機構を明らかにすることを目的とした。

サツマイモ (*Ipomoea batatas* Lam. cv. Norin No. 1) 塊根組織が黒斑病菌 (*Geratocystis fimbriata* Ell. and Halst.) の感染を受けると、その相互作用の結果、塊根組織細胞は抗菌性を有する、いわゆるフィトアレキシンに属するイポキサマロンを主体としたテルペン類を少量に生成する。しかし、感染を受けない新鮮組織及び単なる切断傷害組織においてはテルペン類は生成しない。従って、感染という刺激によって、初めてテルペン類の生成に関与する一連の酵素群が形成されるものと考えられる。なお、 $H_2Cl_2$  投与による傷害を与えることによってテルペン類が生成することが明らかにされている。

本研究は黒斑病菌の感染あるいは  $H_2Cl_2$  投与——サツマイモ塊根組織の系を使用して実験

を行ったものであり、得られた成果は以下の通りである。

## 第一章 黒斑病菌感染及び $HgCl_2$ 投与による HMG-CoA レダクターゼの活性変動並び にその細胞内局在性

高等植物において初めて HMG-CoA レダクターゼの存在を証明した。BSA なしに調整した  $105,000 \times g$  の沈殿に見出される本酵素の 2, 3 の性質として、至適 pH が 7.3-7.5 であること、負の協同性 (negative cooperativity, Hill 係数は 0.81) や基質阻害を示すこと、そして Triton X-100 及びデオキシコレートにより活性化されることなどが明らかとなった。

本酵素 ( $105,000 \times g$ , 沈殿) の活性は新鮮組織や切断組織においては非常に低かった。しかし、黒斑病菌の感染を受けると、被害部隣接健全組織において本酵素活性の急速な増大がみられ、感染後 2 日目で最大に達した。その後、3, 4 日うちに急速に活性が減少した。一方、



本酵素の活性上昇に伴ってテルペン類が生成され、その後の活性減少に伴って、テルペン類生成の速度が小さくなり、両者の変動に相関性が見出された。このことは本酵素がテルペン類の生成に関与していることを示している。またこのような本酵素活性の変動様式は本酵素がテルペン類生成の律速段階にあることを示唆している。

$HgCl_2$ 投与の場合においても実質的には黒斑病菌の場合と同様な本酵素活性及びテルペン類生成量の変動様式を示した。この一連の実験で、新鮮組織及び切断傷部組織ではミトコンドリア画分( $15,000 \times g$ , 沈殿)にのみ本酵素活性が見出された。一方、 $HgCl_2$ 投与によって、初めてミクロゾーム画分( $105,000 \times g$ , 沈殿)に本酵素活性が出現することになった。

黒斑病菌—サツマイモ塊根組織の糸を用いて、本酵素の細胞内局在性を遠心分離法及び白糖密度勾配遠心法によって解析したところ、本酵素活性はミトコンドリアとミクロゾームの

両者に局在することが明らかとなった。そして、新鮮組織及び切断傷害組織ではミトコンドリアのみに、黒斑病菌感染の罹病組織ではミトコンドリアとミクロゾームの両者に局在することがわかった。

以上のことから、黒斑病菌の感染及び  $H_2O_2$  殺菌により、ミクロゾームで出現し、増大する HMG-CoA レダクターゼがテルペン類の生合成に関与するものと結論した。

## 第二章 ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼの活性に及ぼす BSA、基質及び脂質の影響

罹病組織の被害部隣接健全組織からのミクロゾームとミトコンドリアの調製に 1% (w/v) 牛血清アルブミン (BSA) を加えることにより、加えない場合と比較して 2 倍程度高い本酵素活性を保持したミクロゾーム (BSA-treated Ms) とミトコンドリアを得ることができた。また BSA を加えないで調製したミクロゾーム (BSA-not treated Ms) に保持

されている本酵素の活性を測定する際に、反応液に1%(w/v) BSA を加えることによって、その活性が約1.5倍に高められることがわかった。

本酵素は非常に不安定であり、 $30^{\circ}\text{C}$  で30分間のポリイソキュベーションによって50-60%の活性が失われた。この失活は温度依存性であり、 $20^{\circ}\text{C}$  以下のポリイソキュベーションによる失活は少なかった。また残存活性に対する Arrhenius プロットでは  $20^{\circ}\text{C}$  付近で折れ曲がった。またこれから求めた  $20^{\circ}\text{C}$  以下及び以上の活性化エネルギーはそれぞれ、2,900 及び 14,000 cal/mole であった。従って、この失活は単なる熱変性による失活ではなく、酵素的な反応によって誘起されるものと推定された。

この失活は高濃度の BSA, また HMG-CoA と NADPH の両者によって著しく抑制されることがわかった。

本酵素の失活の原因を調べたところ、一度洗淨したミクロゾーム画分を  $30^{\circ}\text{C}$  でイソキュベート

すると遊離脂肪酸の増大が認められ、ミクロゾーム膜の脂質が分解されていることがわかった。一方、外から添加した脂肪酸(パルミチン酸、リノール酸)の本酵素活性への阻害効果は認められなかった。またミクロゾームから抽出した燐脂質の添加は本酵素の失活を抑制した。以上のことから、本酵素の失活の原因はミクロゾーム膜の脂質の分解に伴う本酵素の不安定化によるものと言える。このことはまた本酵素がその活性のために燐脂質を必要とする、いわゆる脂質依存性酵素であることを示唆した。

### 第三章 ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼの可溶化、部分精製並びにその酵素学的性質

ミクロゾーム結合 HMG-CoA レダクターゼの性質を更に詳しく解析するため、可溶化後、部分精製した本酵素の性質を調べた。

本酵素のミクロゾーム膜からの可溶化の最も

効果的な方法はミクロゾーム蛋白質濃度を1-2 mg/ml になるように調整し、最終濃度が20% (w/v) グリセロールの存在のもとで1% (v/v) Triton X-100 による可溶化であった。この結果、60-80%の本酵素が可溶化された。この可溶化した本酵素液を HMG-hexane-Sephrose 4B によるアフィニティークロマトグラフィーを行って精製した。この結果、最終的に得られた酵素液は約17倍に精製され、回収率は約46%であり、高かった。この酵素標品を使用して、磷脂質(ホスファチジルコリン, PC; ホスファチジリエタノールアミン, PE) 及び BSA の添加並びにアリイノキレーションによる活性への影響、更に HMG-CoA と NADPH に対する  $K_m$  値を調べた。

PC と PE は可溶化後、部分精製した本酵素活性をそれぞれ約2と1.5倍に高めた。このこと及び第二章で得た結果から、本酵素が脂質依存性であると結論した。また高濃度の BSA によって、約3倍に活性化されたが、1% (w/v) を越えるとこの活性化はかえって減少した。更に

30°C での フォリイソメーションによる失活は認められず、安定であった。可溶化後、部分精製した本酵素の  $\Delta$ -HMG-CoA 及び NADPH に対する  $K_m$  値はそれぞれ、 $171\mu\text{M}$  及び  $4.6\text{mM}$  であり、BSA-treated Ms に結合している本酵素の両者に対する  $K_m$  値と比較してそれぞれ、約 16 倍及び 10 倍に増大した。この事実は本酵素がミクロゾーム膜に存在することによって両基質に対する親和性が著しく高められることを示している。

本酵素が脂質依存性であること、Arrhenius プロットで少なくとも 2 点で折れ曲がること及び可溶化後、部分精製した本酵素は両基質に対する  $K_m$  値が変化すること、また安定であること等から本酵素がミクロゾーム膜に存在することの意義を次のように考えることができるだろう。

すなわち、本酵素はミクロゾーム膜内における脂質との相互作用の在り方によって、動力的パラメーターの異なるコンホメーションをとることができる。このことは細胞内の環境の変

化(例えば、基質の量的変化)に対応できる機能の多様性が発現することを意味し、このことにより、代謝系の流れを動的に調節することが可能となるものと考えられるだろう。

## 謝辞

終りに臨み、本研究に終始貴重なる御指導を賜わりました名古屋大学教授 瓜谷郁三先生に深く感謝の意を表します。本研究の遂行にあたって御援助して下さった京都大学教授 香月裕彦先生に深く感謝します。また御指導と種々有益なる御助言をいただいた名古屋大学助教授 旭正先生に深く感謝します。更に名古屋大学農学部生物化学研究室の大羽和子博士並びに研究室の皆様にも厚く感謝します。



## 報文目錄

- 1) Suzuki, H., Oba, K. and Uritani, I. (1975)

The occurrence and some properties of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in sweet potato roots infected by Ceratocystis fimbriata.

Physiol. Plant Pathol., 7, 265 - 276.

- 2) Suzuki, H. and Uritani, I. (1976)

Subcellular localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and other membrane-bound enzymes in sweet potato roots.

Plant & Cell Physiol., 17, 691 - 700.

- 3) Suzuki, H. and Uritani, I. (1977)

Effects of bovine serum albumin and phospholipids on activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in sweet potato roots.

Plant & Cell Physiol., 18, in press.