

報告番号 ※ 甲第1093号

主論文の要旨

題名 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

氏名 鈴木 寛

主論文の要旨

報告番号

※甲第1093号

氏名

鈴木寛

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る。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Q)やプラステキノン、光合成色素であるクロロフィルの部分を作るステロール、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これである。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X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。

カイマイモ (*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、いわゆるフィアレキシンに属するイソキサマロンを主体としたテルペン類を多量に生成する。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、 $HgCl_2$ 投与による傷害を与えることによっても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 $HgCl_2$ 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 なしに調製した $105,000 \times g$ 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 日のうちに急速に活性が減りした。一方、本酵素の活性上昇に伴ってテルペン類が生成され、その後の活性減りに伴って、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合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。

HgCl₂ 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害組織ではミトコンドリア画分(15,000×g, 沈殿)にのみ本酵素活性が見出された。一方、HgCl₂ 投与によって、初めてミクロソーム画分(105,000×g, 沈殿)に本酵素活性が出現することがわかった。

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シロ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ソームの両者に局在することが明らかとなった。さて、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ソ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HgCl₂ 投与により、ミクロソームで出現し、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 ミクロソーム結合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ミクロソ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ソーム(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ソーム(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も、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°Cで30分間のアリイン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°C以下でのアリイン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°C付近で折れ曲がった。またこれから求めた20°C以下及び以上で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、一度洗浄したミクロゾーム画分を30°Cでイン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レグクターゼの可溶化、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レグ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1-2mg/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-Sepharose 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; ホスファチジレタノールアミン, PE)及びBSAの添加並びにアフリインキュベ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られた結果から、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)を越えるとその活性化はかえって減少した。更に30°Cでアフリインキュベ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全-HMG-CoA及びNADPHに対する K_m 値はそれぞれ、171 μ M及び4.6mM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 値が増大すること、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、熱力学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。