

氏名	清 水 勇 しみず いさむ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 307 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	酵母のメバロン酸生合成に関与する諸酵素のミトコンドリア 局在性
論文調査委員	(主 査) 教 授 香 月 裕 彦 教 授 波 多 野 博 行 教 授 丸 山 和 博

論 文 内 容 の 要 旨

酵母のステロール生合成において、ラノステロールの脱メチル化に至るまでの経路は動物の場合とほぼ同様なものと考えられている。最近、動物のステロール生合成の調節機作の解明が多くの研究者によってとり上げられ、その結果、ステロール生合成の初期段階において、 β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (=HMG-CoA) を還元してメバロン酸を与える反応を触媒する HMG-CoA reductase が重要な役割を果たしていることが判明して来た。

申請者は、酵母の HMG-CoA reductase について調べたところ、これまで予想されていたものとは異なり、細胞内においてミトコンドリアに分布することを発見した。すなわち酵母細胞をメルカプトエタノール、ついで β -グルクロニダーゼで処理し、細胞壁をこわし、スフェロプラストを形成させ、これをホモジナイザーで穏やかに破碎した。ついで、常法に従い、遠心分画し、ミトコンドリア、マイクロゾーム、核、チトプラズマなどの諸画分に分けた。さらにミトコンドリア画分については、蔗糖密度勾配遠心分離にかけ、さらに細い分画を行った。各分画について HMG-CoA reductase の分布を調べたところ、ミトコンドリアの指標酵素であるコハク酸脱水素酵素と共に、その大部分はミトコンドリア画分に存在することが分った。酵素の細胞内分布については、菌の生長期と深い関係があることが知られているので、対数増殖期および定常期について上記の検討を行ったが、いずれの場合にもミトコンドリア画分に大部分の活性が見出された。

本酵素のほかに、ステロール生合成の初期段階の反応を触媒する acetoacetyl-CoA thiolase についても同様な研究を行ったが、本酵素の活性はチトプラズマとミトコンドリア両画分に分布することが分った。

次に、ミトコンドリアを破壊して得た標品を酵素として用い、これに ^{14}C -酢酸および非放射性メバロン酸を加えて反応させ、生成物をガスクロマトグラフィーによって分析したところ、放射能はメバロン酸画分のみに見出された。ミトコンドリア以外の画分を用いた場合には、酢酸からメバロン酸への転換は認められなかった。同様に ^{14}C -メバロン酸および ^{14}C -HMG-CoA を基質として用い、これらの画分にお

ける生合成活性を調べた結果、ステロール生合成のために酢酸からメバロン酸に至る反応を触媒する酵素はミトコンドリアに、さらにメバロン酸からファルネシルピロリン酸に至る反応を触媒する酵素はチトプラズマに局在することを明らかにした。動物の系では酢酸からメバロン酸に至るステロール生合成の初期段階の反応を触媒する諸酵素のうち大部分がチトプラズマにあり、HMG-CoA reductase のみがミクロゾームに存在する事実と対照すると、上記の発見はたいへん興味深い。

また酵母の培養において、嫌気条件から好気条件に移すと、ステロール生合成能が増加することが知られていたが、acetoacetyl-CoA thiolase と HMG-CoA reductase の活性を測定した結果、そのレベルの増加が観察された。この実験において、クロラムフェニコールなどの蛋白合成阻害剤を添加することにより、これらの酵素活性の上昇は阻害された。したがって、これら2つの酵素を始めとするステロール生合成初期段階の酵素は、ミトコンドリア形成と共に合成され、そのために活性上昇が起こるものと結論された。

参考論文 1) は上記の問題に関連したものであるが、2) はチトプラズマに分布する acetoacetyl-CoA thiolase の生理機能を推論したものである。酵母の無細胞抽出液に acetoacetyl-CoA を加えると、コハク酸との間に CoA の転移反応を起こし、アセト酢酸と succinyl-CoA とを生じる。前者は脱炭酸を起こし、アセトンとなるが、この代謝系は一つの可能性として、チトプラズマにおける succinyl-CoA の供給系として種々の生合成に役立つことを指摘したものである。

論文審査の結果の要旨

近年、代謝調節に関する研究の進展に伴い、ステロール生合成の調節機作の解明をめざして、多くの試みがなされている。このためには、広範囲な角度からの研究が必要であるが、まず、その酵素系の細胞内分布について正確な知見を得ることが不可欠である。

動物のコレステロール生合成の初期反応を触媒する酵素系はチトプラズマに存在し、例外として、 β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (=HMG-CoA) reductase のみがミクロゾームに分布することが、H. Rudney らによって明らかにされた。彼らは酵母のエルゴステロール生合成の系についても研究を行い、動物の場合と同様な酵素系の分布を想定していた。

上記の HMG-CoA reductase は動物のコレステロール生合成系にあっては重要な調節点の一つとされているので、申請者はこの点に注目し、酵母の本酵素の性質について研究を進めて来た。本申請論文の研究においては、本酵素の細胞内分布をとり上げ、注意深い検討を重ねた結果、本酵素がミトコンドリアに局在することを明らかにした。酵母の細胞壁が比較的強固であるのに反して、その細胞顆粒はこわれ易く、そのため細胞分画法は必ずしも容易ではないとされている。申請者はカタツムリの β -glucuronidase を用いて細胞壁破壊の条件検討を入念に行った結果、上記の貴重な発見に到達できたといえる。これを契機にして、酢酸からメバロン酸生合成に至るまでの酵素系の分布について研究したが、このうち acetoacetyl-CoA thiolase はミトコンドリアおよびチトプラズマの両方に分布することを証明し、H. Rudney らの研究を確認することができた。HMG-CoA 合成酵素については、方法論的にその活性を測定することはできなかつた。しかし、各細胞画分を用いて系統的に酵素系の分布について研究した結果、酢酸からメバロン酸に至るまでの反応はミトコンドリアにおいて行なわれることを発見した。この事実は、

これまで H. Rudney らによって想定されていたものとは全く異なるものであり、画期的な発見といえることができる。1971年に来日した H. Rudney によってもこのことは承認され、高い評価を受けた。この研究結果から、酵母においてはステロール生合成とミトコンドリア形成とは密接な関係にあり、酵母を嫌気条件から好気条件に移すことにより、ミトコンドリア形成と共に、酢酸からメバロン酸生成に与る酵素の合成が誘導され、その結果、ステロール生合成が活性化されることが明らかとなった。以上の研究は単に酵母のステロール生合成に関与する酵素系の細胞内分布を明らかにしたのに留らず、その調節機作の解明に多大の貢献をしたものといえることができる。

また、acetoacetyl-CoA thiolase についても、チトプラズマに分布するアイソザイムの生理機能については全く不明の状態であったが、参考論文に示された研究によって興味ある可能性が示された。その証明には今後の研究が必要であるが、この研究は貴重な貢献といえることができる。

よって、申請者の論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。