

氏名	堀川三郎
	ほりかわさぶろう
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第549号
学位授与の日付	昭和55年3月24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	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Cell-Free Translation and Regulation of <i>Candida lipolytica</i> Acetyl-Coenzyme-A Carboxylase Messenger RNA
	(<i>Candida lipolytica</i> のアセチルコエンザイムAカルボキシラーゼ メッセンジャー RNA の無細胞系による翻訳と調節)
	(主査)
論文調査委員	教授村地孝 教授早石修 教授沼正作

論文内容の要旨

アセチル CoA カルボキシラーゼは長鎖脂肪酸合成の最初の段階を触媒する酵素であり、脂肪酸合成の調節に重要な役割を果している。当研究室では炭化水素資化性酵母、*Candida lipolytica* を高等動物の実験モデルとして、本酵素発現の調節機構を解析しており、これまでに脂肪酸を唯一の炭素源として生育した *C. lipolytica* 細胞では本酵素活性がブドウ糖を炭素源として生育した細胞の10%程度に低下すること、この酵素活性の低下は、細胞内の本酵素量が減少した結果であり、またこの酵素量の減少は本酵素の合成速度の抑制に基づくものであることを明らかにした。

本論文は、アセチル CoA カルボキシラーゼの合成速度の調節が、本酵素の鋳型となるメッセンジャー RNA の量の変化に起因するものであるか否かを明らかにすることをこの目的とし、そのために先ず無細胞蛋白合成系を用いて本酵素メッセンジャー RNA 量を定量する方法を確立し、その方法を用いて、ブドウ糖生育細胞並びに脂肪酸生育細胞における本酵素メッセンジャー RNA 量を比較した。

無細胞蛋白合成系を用いた本酵素メッセンジャー RNA 定量法の概要は以下の如くである。ブドウ糖培地で生育した *C. lipolytica* 細胞をガラスビーズを用いて破碎し、抽出液の遠心上清をフェノールで除蛋白し、得られた粗 RNA 画分をポリ(U)セファロースカラムで精製してポリ(A)を含んだメッセンジャー RNA 画分を得た。この RNA を [³⁵S]メチオニンと共にウサギ網状赤血球由来の無細胞蛋白合成系に加えて翻訳させた。得られた標識翻訳産物に本酵素に対する家兎抗体を加え、更に家兎免疫グロブリン G に対するヤギ抗体を加えてできた抗原抗体反応沈降物を分離し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ない、そのラジオオートグラムをとって翻訳産物を解析した。

その結果、1) 本酵素抗体によって沈降した翻訳産物の一つは精製本酵素と同じ分子量(23万)を示した。2) 分子量23万の翻訳産物の沈降は抗原抗体反応の際、大過剰の精製本酵素によって完全に拮抗された。3) 分子量23万の翻訳産物をパインまたは α -キモトリプシンで部分分解すると、精製本酵素と全く同じ分解様式を示した。4) 分子量23万の翻訳産物の生成は無細胞蛋白合成系に加えたメッセンジャー

RNA 量に応じて増加した。以上の結果から、分子量23万の本酵素が無細胞蛋白合成系で完全に合成されていること、及び分子量23万の翻訳産物を指標にして本酵素メッセンジャー RNA 量を定量的に測定できることが明らかになった。

そこで、種々の濃度の脂肪酸を加えた培地で生育させた *C. lipolytica* 細胞におけるアセチル CoA カルボキシラーゼ活性を測定し、同時に本酵素メッセンジャー RNA 量を定量したところ、脂肪酸濃度の増加に伴い両者が共によく一致して減少していることが明らかとなった。

以上の結果より、脂肪酸培地で生育した *C. lipolytica* 細胞における本酵素合成速度の抑制は、本酵素メッセンジャー RNA 量の減少の結果であることを結論した。これは本酵素発現の調節が本酵素遺伝子からメッセンジャー RNA への転写の段階で行なわれていることを強く示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

アセチル CoA カルボキシラーゼは長鎖脂肪酸生合成の最初の段階を触媒する酵素であり、脂肪酸生合成の調節に重要な役割を果している。著者は、本酵素生合成の分子レベルでの調節機構を明らかにするために、動物細胞の実験モデルとして炭化水素資化性酵母、*Candida lipolytica* を用い、脂肪酸の本酵素メッセンジャー RNA (mRNA) 量の変動に及ぼす影響を無細胞タンパク合成系を用いて検索した。

その結果、種々の濃度の脂肪酸を加えた培地で生育させた細胞における本酵素 mRNA 量が、脂肪酸濃度の増加に伴い本酵素活性レベルと平行して減少することを明らかにした。この結果より、脂肪酸を含んだ培地で生育した細胞における本酵素の合成速度の抑制に基づく酵素量の低下は、本酵素 mRNA 量の減少に基因していることを明らかにした。なお分子量が大きくかつ細胞内濃度が低い本酵素の無細胞系による完全な合成は非常に難しく、著者が初めて成功したものである。以上の成果は、脂肪酸生合成の調節機構の解明に寄与するところが非常に大きい。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。