

Studies on peroxisomal ATPases ; their characterization and physiological functions

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16040

氏名	清水 栄
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第102号
学位授与の日付	平成7年9月26日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	ペルオキシソーム ATPases の発見とその性質および生理機能 (Studies on peroxisomal ATPases ; their characterization and physiological functions)
論文審査委員	(主査) 大熊 勝 治 (副査) 板垣 英 治, 五味 保 男 二階堂 修, 正宗 行人

学位論文要旨

Summary Clofibrate increased oligomycin-resistant ATPase activity in peroxisomes more than 17-fold (5.15 ± 0.71 milliunits/mg protein) in rat liver. The activity was dependent on divalent cations ($Mg^{2+} > Ca^{2+}$) with an optimum pH of 7.5. This activity was partially inhibited by *N*-ethylmaleimide (NEM). Proteinase K digestion of intact peroxisomes severely reduced the NEM-sensitive activity, but little affected the NEM-resistant activity. NEM-sensitive and -resistant ATPases showed K_m values for ATP of 780 and $73 \mu M$, respectively. The NEM-sensitive activity was inhibited completely by NBD-Cl, DIDS, TBT, and quercetin, and partially by DCCD and STA, whereas the NEM-resistant activity was totally insensitive to these chemicals except for STA. They were partially separated by gel filtration chromatography and had molecular masses of 520kDa (NEM-sensitive enzyme) and 450kDa (NEM-resistant enzyme), respectively. Neither of these peroxisomal ATPases was associated with the 70kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) because of their different behaviors on proteinase K treatment, immunoprecipitation with anti-PMP70 IgG, native PAGE, and gel filtration chromatography. Several inhibitors for ATPase activity as described above, inhibited the acyl-CoA oxidase import into purified rat liver peroxisomes *in vitro* and the microinjected human serum albumin conjugated to a peroxisomal targeting signal 1 (HSA-SKL) into peroxisomes of living CHO cells. These results suggest that the peroxisomal ATPases are involved in the import of proteins.

真核細胞に広く存在するオルガネラの一つとして、de Duve はラット肝臓に過酸化水素を生成するオキシダーゼ群と分解するカタラーゼを含むオルガネラを見出し、機能的名称としてペルオキシソームと命名した。ラット肝臓では一群の高脂血症治療薬やプラスチック可塑剤などで増殖するという興味深い性質を持つにも関わらず、生理的意義のない原始呼吸に寄与していたような酵素群が残存した化石のようなオルガネラと冷遇されていた。ところが、1976年 Lazarow と de Duve により、ミトコンド

リアにのみ存在すると信じられていた脂肪酸の β -酸化系がペルオキシソームに発見され、その活性が高脂血症治療薬投与により著しく上昇することが報告され、一躍ペルオキシソームの機能が脚光を浴びるに至り、以来約30年を経て様々な重要な機能が知られるようになった。

我々はラット肝ペルオキシソーム膜上に高脂血症治療薬クロフィブレートで約17倍に著しく誘導されるオリゴマイシン耐性 ATPase 活性 (5.15 ± 0.71 milliunits/mg protein) を発見した。2価カチオン ($Mg > Ca$) 要求性であり、その至適 pH は 7.5 であった。この活性は *N*-ethylmaleimide (NEM), 4,4'-dithiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), silicotungstic acid (STA) および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) で部分阻害を受けた。intact ペルオキシソームを Proteinase K で限定蛋白分解処理すると NEM 感受性活性は速やかに消失し、非感受性活性はほとんど変化しなかった。NEM 感受性および非感受性 ATPase の ATP に対する K_m 値はそれぞれ 780 および $73 \mu M$ であった。NEM 感受性 ATPase 活性は DIDS, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-CI), tributyltin chloride (TBT) および quercetin で完全阻害され、DCCD と STA により部分阻害を受けた。一方、NEM 非感受性活性は STA 以外の阻害剤に耐性であった。両活性はそれぞれ異なる 2 価カチオンならびにアニオン要求性、基質特異性を示した。その阻害剤感受性などより、いずれも新規 ATPase と推定した。ペルオキシソーム膜 $C_{12}E_9$ 抽出物のゲルろ過クロマトグラフィーの結果、それぞれ 520, 450 kDa のオリゴメリック複合体と推定した。ペルオキシソームの 70 kDa 主要膜たんぱく (70 kDa peroxisomal membrane protein; PMP70) は ATP 結合性たんぱくと推定されているが、その ATPase 活性は見出されていない。我々の発見した両 ATPase 活性はいずれもこの PMP70 と異なることを proteinase K 処理、免疫沈降、未変性 PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィーにより明らかにした。同時に、ペルオキシソームマトリックスに無機ピロフォスフォターゼ (PPase) の存在することも発見した。

ペルオキシソーム ATPase の機能としては基質能動輸送あるいはペルオキシソーム酵素たんぱく移送に関与すると考えられる。ペルオキシソーム局在性酵素である acyl-CoA oxidase, acyl-CoA : dihydroxyacetonephosphate acyltransferase 反応の基質輸送について種々検討したが、intact ペルオキシソームにおける ATP による活性化 (ATP 添加により消失する潜在性) は認められず、ATPases の関与は否定的であった。一方、たんぱく移送について、*in vitro* acyl-CoA oxidase import 系と HSA-SKL (peroxisome targeting signal 1 である C 末端 SKL 配列を結合させたヒト血清アルブミン) マイクロインジェクション法で検討した。前者の系においては、DCCD, STA, および quercetin に、後者の系においては、NEM, TBT, および STA に阻害効果が認められペルオキシソーム ATPases の関与を示唆する結果を得た。

以上、ラット肝ペルオキシソームにすくなくとも 2 種の ATPases が存在すること、それらの性質および生理機能について明らかにすることが出来た。今後、ATPases の分子構造の解明と蛋白移送機構の解明が期待される。高脂血症治療薬として HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (プラバスタチン, シンバスタチン) の他、フィブレート系薬剤 (クロフィブレート, ベザフィブレードなど) が用いられている。フィブレード系薬剤によるペルオキシソーム誘導現象は齧歯類に限られており、ヒトでは顕著な誘導は見られず、高脂血症治療機序の詳細は不明である。ペルオキシソームは脂質の分解だけでなく生合成にも深く関与しており、ペルオキシソーム ATPases が PPase と相まって、その酵素蛋白移送機構を介した、あるいはその誘導機構を介した脂質代謝調節機構やその異常に起因する病態に関わる可能性があり、興味を持たれる。

参考論文

- (1) Shimizu, S., Imanaka, T., Takano, T., & Ohkuma, S. Induction and characterization of two types of ATPase on rat liver peroxisomes. *J. Biochem.*, 112(3), 376-384 (1992)
- (2) Shimizu, S., Imanaka, T., Takano, T., & Ohkuma, S. Major ATPases on clofibrate-induced rat liver peroxisomes are not associated with 70 kDa peroxisomal membrane

- protein (PMP70). J.Biochem., 112(6), 733-736 (1992)
- (3) Shimizu, S., & Ohkuma, S. Inorganic pyrophosphatase of clofibrate-induced rat liver peroxisomes. J.Biochem., 113(4), 462-6 (1993)

学位論文の審査結果の要旨

当該論文に関し、まず、各審査委員が申請者に対してそれぞれ個別に面接諮問を行い、更に7月25日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえて、同日の審査委員会において慎重審議を行った結果、次のとおり判定した。

本研究は、ラット肝ペルオキシソーム膜上の ATPase の酵素化学的な特徴を明らかにするとともに、その生理機能の解明を目指したものである。ペルオキシソームは各種酸化酵素を含有するものの、その生理機能は長らく不明であったが、最近脂肪酸の β 酸化系の諸酵素が発見されるに至り、その脂質代謝における機能や生合成機構が注目されている。これに対して申請者は、ラット肝ペルオキシソーム膜上に、ミトコンドリアの混入に基づくものとは考えられない ATPase 活性が存在し、しかもそれが高脂血症薬であるクロフィブレートによって顕著に誘導される真にペルオキシソームの酵素であること、さらに、本酵素活性が NEM 感受性酵素および NEM 非感受性酵素の二種類の酵素によるものであることを明らかにするとともに、両者の酵素的諸性質を明らかにした。その結果、いずれも全く新しいタイプの ATPase であることが判明した。更に、申請者は、両 ATPase の生理的機能の解明を目指して検討を重ねた結果、NEM 非感受性 ATPase がペルオキシソーム生合成の際の酵素蛋白質輸送に関与している可能性を示唆する結果を得た。

以上の結果は、従来全くその存在が知られていなかった新規の ATPase がラット肝のペルオキシソーム膜上に存在することを初めて明らかにするとともに、それらの生理機能に検討を加え、その一端を明らかにしたものであり、ペルオキシソームの新たな機能解明に指針を与える業績である。よって、その内容は博士（薬学）論文に値する。