

## 牛肺臓プロスタグランジンF合成酵素の全一次構造とカエル水晶体P-クリスタリンの精製並びにその性質

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2012-05-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 豊 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10098/5357">http://hdl.handle.net/10098/5357</a>

## 牛肺臓プロスタグランジンF合成酵素の全一次構造と カエル水晶体 $\rho$ -クリスタリンの精製並びにその性質

藤 井 豊

化 学 教 室

(平成元年10月31日受理)

### 一抄 録一

牛肺臓プロスタグランジン (PG) F合成酵素の全一次構造がペプチド及びcDNA分析により決定された (Watanabe, K., Fujii, Y., Nakayama, K., Ohkubo, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Nakanishi, S., and Hayaishi, O.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 11 (1988))。本酵素の一次構造は人肝臓アルデヒド還元酵素並びにラット水晶体アルドース還元酵素とそれぞれ62及び67%の高い相似性を示した。これらの酵素は幅広い基質特異性を有し、分子形態及び一次構造のレベルでアルド・ケト還元酵素のスーパーファミリーを形成していると考えられる。カエル水晶体に特異的な構造蛋白質である  $\rho$ -クリスタリンは現在までにそのC末端側約 $\frac{2}{3}$ 相当 (225残基) の部分一次構造が Tomarev らにより決定されているが、驚くべきことにその部分一次構造はPGF合成酵素と77%の高い相似性を示した。

我々は食用ガエル (*Rana catesbeiana*) 水晶体より Sephadex G-100、Red Sepharose、そして Mono S を用いて 2 種の  $\rho$ -クリスタリン (RHO-I 及び RHO-II) を高度に精製した。RHO-I 及び RHO-II の N 末端構造に差異 (前者はアシル化、後者はフリー) が認められたが、両者は共に部分一次構造及び免疫化学的に同一の遺伝子産物 (蛋白質) と判明した。両クリスタリンは共に NADPH 結合能力 (0.75モル/モル蛋白質) を持ち、分子量35,000の単量体であった。また、新たに決定された  $\rho$ -クリスタリンの N末端構造 (107残基) もまた PGF 合成酵素と76%の高い相似性を示した。これらの結果は、 $\rho$ -クリスタリンが一次構造、NADPH 結合能力及び分子形態上アルド・ケト還元酵素の一員であることを示すものである。しかし、PGF 合成酵素の基質である  $\text{PGH}_2$  を良い基質とせず、僅か 2% の比活性を示すのみであった。またアルド・ケト還元酵素の代表的基質である 9,10-phenanthrenequinone, p-nitrobenzaldehyde, DL-glyceraldehyde 等あるいは  $\text{PGD}_2$  や  $\text{PGE}_2$  をも基質としなかった。従って、酵素学上  $\rho$ -クリスタリンはアルド・ケト還元酵素と異なる。 $\rho$ -クリスタリンはカエル水晶体中、全可溶性蛋白質の 17.6% にも達するが、もし本クリスタリンが通常のタンオーバー数

を持つ酵素であれば、この含量は生理的必要性をはるかに越えるものと考えられる。しかし、PGH<sub>2</sub>から生理活性物質であるPGF<sub>2</sub>αの生合成に関して、PGF合成酵素の僅か2%の活性は、水晶体に於て合目的性があるのかも知れない。一方、水晶体のクリスタリンはその生涯代謝されることなく、水晶体の重要な役割である透明性維持の機構を果たすにはクリスタリンに極めて高い熱力学的安定性が要求される。その意味で、ρ-クリスタリンになおNADPH結合能力が保持されていることは安定な蛋白質の立体構造を維持する上で極めて重要な意義を持つと考えられる。

## 1. 緒 言

1981年渡部らにより、ラット肺臓においてPGD<sub>2</sub>よりPGF<sub>2</sub>を生成する高い酵素活性が見出され、ウシ肺臓よりその酵素が単一にまで精製された(1, 2)。本酵素はNADPH依存的にPGD<sub>2</sub>から9α, 11β-PGF<sub>2</sub>の、またPGH<sub>2</sub>からPGF<sub>2</sub>αの還元反応をそれぞれ異なる活性部位で触媒するユニークな酵素でありPGF合成酵素と名付けられた。本酵素はまた、幅広い基質特異性を有し種々のアルド・ケト化合物(9, 10-phenanthrenequinone, p-nirtobenzaldehyde)を還元し、アルド・ケト還元酵素の一員と考えられている。アルド・ケト還元酵素はアルデヒド還元酵素、アルドース還元酵素、及びカルボニール還元酵素より成り、分子量30,000~40,000の単量体であり各組織に広く分布するが、未だこれらの生理的意義については確立したものが無い。これら酵素の分子論的解析を行なうためには一次構造の解明は必要不可欠のものであり、またPG類に対する基質特異性を把握することは有意義である。

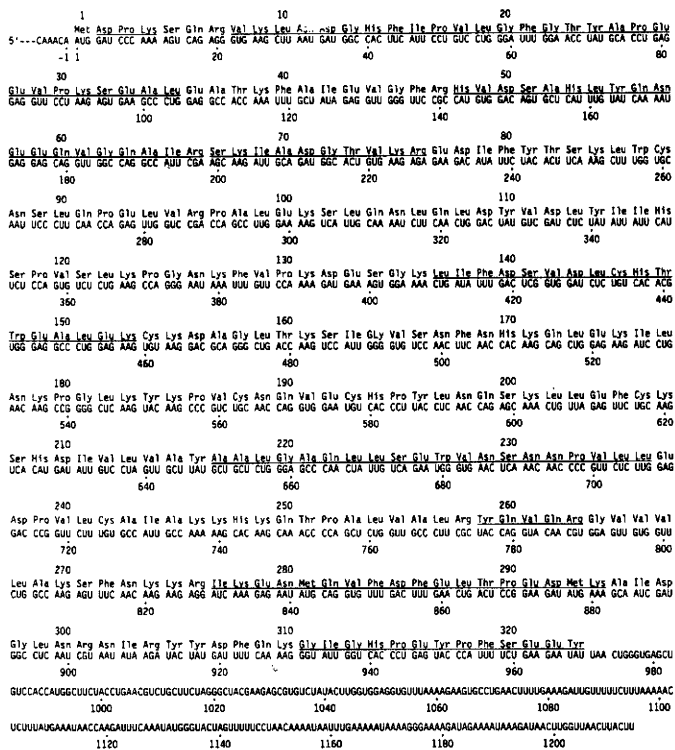
目の水晶体に存在する可溶性蛋白質は一般的にクリスタリンと呼ばれているが、近年、WistowとPiatigorskyは脊椎・無脊椎動物の種特異的なクリスタリンが酵素と非常に関係していることを提言している(3-6)。例えば、ε-, δ-, τ-及びS<sub>m</sub>-クリスタリンは、それぞれlactate dehydrogenase、arginosuccinate lyase、enolase、そしてglutathione S-transferaseと一次構造上高い相似性を示している。ρ-クリスタリンはカエル水晶体に特異的な構造蛋白質であり、分子量35,000~40,000の単量体ともオリゴマーとも言われている。Tomarevら(7)が報告したように、本クリスタリンの部分一次構造(C末端から225残基)はcDNA分析によりすでに決定されており、酵素との関連が注目を集めている。

## 2. 研究内容

PGF合成酵素の一次構造決定の目的で始めに本酵素の部分アミノ酸配列を分析した。本酵素を渡部らの方法で精製し(2)、カルボキシメチル化後トリプシン消化した。この消化物を逆層HPLCを用いて各ペプチドを精製し、Metを含むペプチドより以下のアミノ酸配列を決定した：Ile-Lys<sup>2</sup>-Glu-Asn-Met-Gln-Val<sup>7</sup>-Phe-Asp-Phe-Glu-Leu-Thr-Pro<sup>14</sup>-Glu-Asp-Met-Lys<sup>18</sup>。アミノ酸残基2-7及び14-18に対応する可能なオリゴヌクレオチドを合成し、PGF合成酵素をコードするcDNAをスクリーニングした。渡部らは、得られたcDNAよりPGF合成酵素の

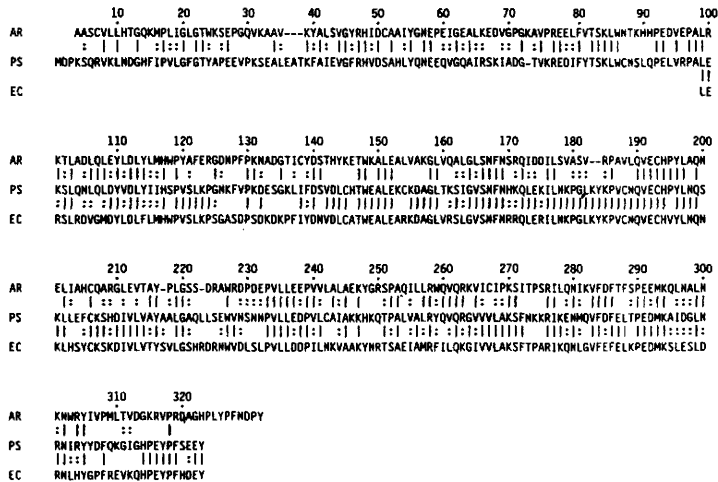
牛肺臓プロスタグランジンF合成酵素の全一次構造とカエル水晶体  $\rho$ -クリスタリンの精製並びにその性質

全一次構造を図1のように決定した(8)。本酵素はEdman分解に抵抗し、従ってそのN末端はブロックされていると考えられる。トリプシン消化ペプチドの中で同様にEdman分解に抵抗するペプチドを見出した。本ペプチドはAsx、Pro、及びLysより成るが、70%ギ酸で処理することによりPro-Lysの配列が確認された。トリプシンの特異性から、Lys残基は本ペプチドのC末端であり従ってAsxがN末端であると思われる。70%ギ酸で切断を受ける結合はAsp-Pro結合であり、Asn-ProやPro-Asx結合でないことにより、本ペプチドのアミノ酸配列をAsp-Pro-Lysと決定した。この配列は本酵素のN末端配列(但しInitiation Metを除く)と一致している。また、トリプシン消化トリデカペプチド(Gly-Ile-Gly-His-Pro-Glu-Tyr-Pro-Phe-Ser-Glu-Glu-Tyr)のC末端Tyr以後、LysまたはArgの検出が全く認められず、本ペプチドはPGF合成酵素のC末端由来であると考えられ、事実図1に示したように本酵素のそれと一致した。付け加えていくつかのペプチドより、cDNAより決定したアミノ酸配列を確認している。以上のように決定したPGF合成酵素の一次構造は322個のアミノ酸より成り、分子量は36,517と求められた。本酵素にはMetは2個しか含まれていなかったわけだが、幸いにも我々はその2個のMetを同定できたのであった。



Primary structure of bovine lung PGF synthase mRNA. The nucleotide sequence of mRNA was deduced from that of the cDNA inserts in clones pPF13, pPF131, and pPF41. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction beginning with the first residue of the AUG triplet that codes for the initiation methionine. Nucleotides on the 5' side of residue 1 are indicated by negative numbers. The predicted amino acid sequence of PGF synthase is displayed above the nucleotide sequence. Underlined amino acids described completely matched the amino acids of PGF synthase identified by peptide analysis of the chemically modified fractions of the enzyme as described.

図1. PGF合成酵素の全一次構造



Comparison of PGF synthase (PS) with human liver aldehyde reductase (AR) and European common frog lens  $\epsilon$ -crystallin (EC). Amino acid sequences are described with the standard single-letter notation for amino acid residues. Amino acid residues are numbered according to PGF synthase. Bars and colons between the sequences indicate exact matches and conservative substitutions, respectively.

図 2. PGF合成酵素(PS)、アルデヒド還元酵素(AR)、及び $\rho$ -クリスタリン(EC)の部分または全一次構造の比較

Protein Data Bank により、PGF 合成酵素の一次構造は人肝臓アルデヒド還元酵素のそれと62% (図2)、またラット水晶体アルドース還元酵素のそれと67%の高い相似性をそれぞれ示した(8,9)。これら3つの酵素は基質特異性及び分子形態のみならず、一次構造においてもアルド・ケト還元酵素のスーパーファミリーを形成していることが判明した。林らは人肝臓よりアルデヒド還元酵素を Wermuth らの方法(10)で高度に精製し、PG類に対する基質特異性を評価した(11)。本酵素はPGD<sub>2</sub>を良い基質としなかったが、PGH<sub>2</sub>を還元しPGF<sub>2</sub> $\alpha$ を生成することが明らかにされた。PGH<sub>2</sub>に対するKm値は100 $\mu$ MとPGF合成酵素のそれ(10 $\mu$ M)と比較して高いが、比活性は約2倍高いものであった。さらに渡部らにより、ラット水晶体アルドース還元酵素もまたPGH<sub>2</sub>を還元してPGF<sub>2</sub> $\alpha$ を生成することも知られている(12)。PGH<sub>2</sub>は牛肺臓PGF合成酵素、人肝臓アルデヒド還元酵素、並びにラット水晶体アルドース還元酵素の基質となっているが、本化合物はエンドパーオキシドでありアルド・ケト化合物でないことを考えあわせると非常に興味深い結果である。生体内において、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ の生合成に関してこれらアルド・ケト還元酵素の果たす役割が注目を集めている。一方、PGF合成酵素の一次構造は予期せずしてカエル(European common frog (*Rana temporaria*))水晶体の $\rho$ -クリスタリンと最も高い(77%)相似性を示すことが判明した(図2)(8)。我々は、 $\rho$ -クリスタリンを食用ガエル(*Rana catesbeiana*)水晶体より高度に精製し、その酵素学的、免疫学的、及び生化学的性質の検討を試みた(13)。 $\rho$ -クリスタリンはSDS-PAGEで分子量35,000の蛋白質として検出した。また、アルド・ケト還元酵素と一次構造上の相似性が認められていることにより、9,10-phenanthrenequinone (10 $\mu$ M)を用いてカルボニール還元酵

素、p-nitrobenzaldehyde (1 mM) を用いてアルデヒド (又はアルドース) 還元酵素、PGD<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) を用いてPGF合成酵素、そしてPGE<sub>2</sub> (0.1mM) を用いてPGE<sub>2</sub> 9-ケト還元酵素をそれぞれ追跡調査した。カエル水晶体の粗抽出液中 $\rho$ -クリスタリンは主要な蛋白質として検出された (図3)。Sephadex G-100によるゲルろ過で抽出蛋白質は3つのピークに分離し、本クリスタリンの溶出パターンは第2の蛋白質ピークと一致した (図4)。精製された $\rho$ -クリスタリンも同じ位置に溶出され、ゲルろ過での分子量は約30,000と求められた。従って本クリスタリンは単量体と考えられる。上記4種の酵素活性は全て $\rho$ -クリスタリンと共に溶出している。この画分のヌクレオチド依存酵素のアフィニティー樹脂であるRed Sepharoseを用いたクロマトグラフで、本クリスタリンはKClの濃度勾配で溶出 (約0.35 M KCl) して来たが、その溶出パターンは非対称であった (図5)。この結果は $\rho$ -クリスタリンが単一のものではないことを示唆する。一方、4種の酵素活性パターンは何れも本クリスタリンのものとは一致せず、 $\rho$ -クリスタリンとこれら酵素活性は別ものであることが伺われた。 $\rho$ -クリスタリン画分 (Fraction AとB) は次のMono Sを用いたカチオン交換クロマトグラフにかけられた。リン酸濃度のグラージェントで2つに分離し、その溶出順序からRHO-I及びRHO-IIと名付けられた (図6)。これらの結果は先の結果を良く説明できる。アルデヒド還元酵素はカラムを素通りし、カルボニール還元酵素及びPGE<sub>2</sub>還元酵素活性の溶出パターンは明らかに両クリスタリンのものとは一致していない。PGF合成酵素の有意な活性は何処にも検出されなかった。最終的に両クリスタリンはMono Sを用いたリクロマトグラフで精製された (図3)。

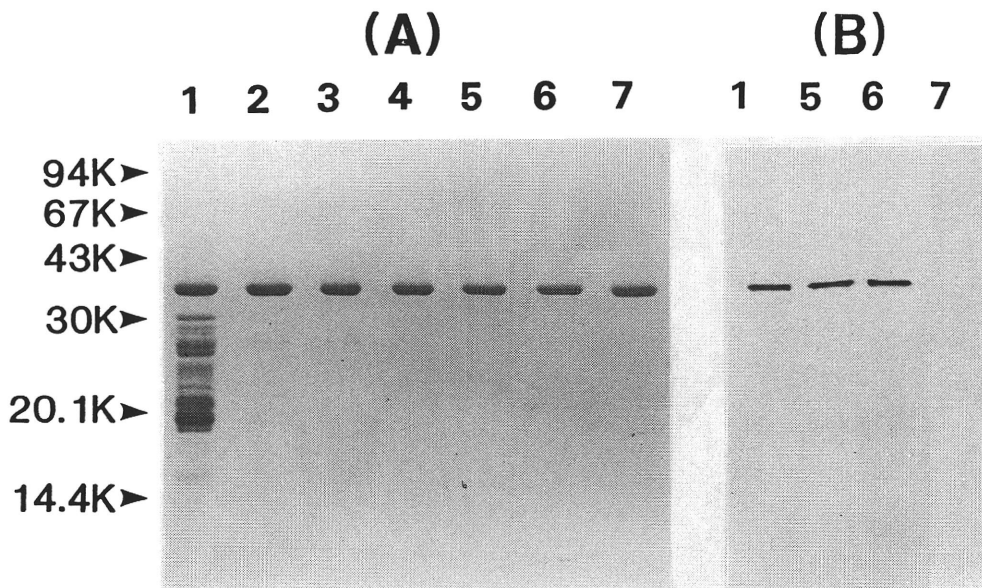


図3. SDS-PAGE (A: 蛋白質染色、Western-blot (B: 抗 $\rho$ -クリスタリン抗血清)): 粗抽出液 (1)、G-100画分 (2)、Fractions A (3) B (4)、RHO-I (5)、RHO-II (6)、PGF合成酵素 (7)。

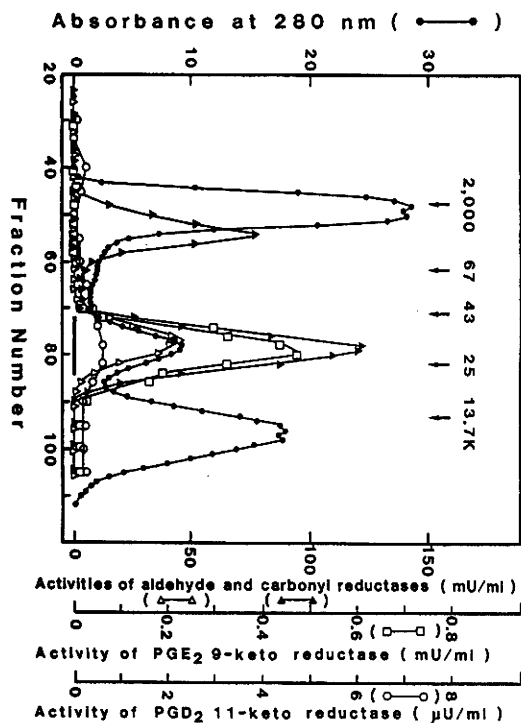


図4. カエル水晶体粗抽出液の Shephadex G-100 ゲルろ過クロマトグラフ

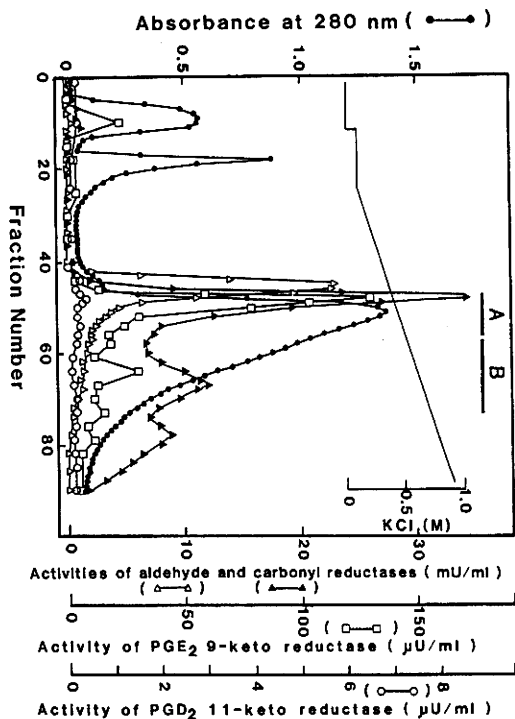


図5. G-100画分の Red Sepharose クロマトグラフ ; Fraction AとBに分けた。

図6. Mono S クロマトグラフ ; Fraction A(A)、Fraction B(B)。リン酸のグラージェント (10-100mM、60min)

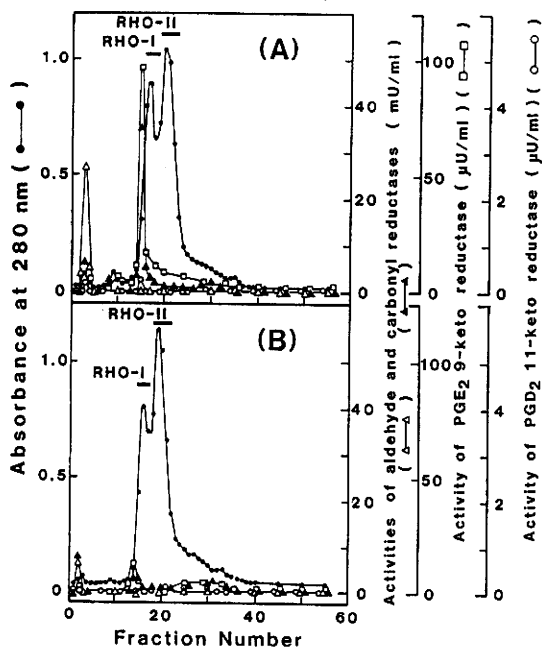


表1に示したように、両クリスタリンともPGF合成酵素、アルデヒド還元酵素（またはアルドース還元酵素）、カルボニール還元酵素及びPGE<sub>2</sub> 9-ケト還元酵素活性を殆ど持たないものであった。更に、表2に示したように、アルド・ケト還元酵素の良い基質であるDL-glyceraldehyde、D-glucuronic acid、D-glucose、D-xylose、menadione、p-nitobenzaldehyde、dihydroxyacetone、succinic semialdehyde及びphenylglyoxalは本クリスタリンの良い基質とならなかった。ところが、予期せずしてPGH<sub>2</sub> 9,11-endoperoxide還元酵素活性が両クリスタリンに検出された。しかし、これらの活性はPGF合成酵素（2）やアルデヒド還元酵素（11）の約2%と低いものであった。

我々は先のFraction B（SDS-PAGEで単一標品、図3）を用いて $\rho$ -クリスタリンの抗体を調整し、RHO-I及びRHO-IIのラジオイムノアッセイを試みた。図7に示したように、両クリスタリンの標準曲線は全く等しく両者は免疫学的に同等の蛋白質であるといえる。一方、PGF合成酵素の滴定曲線は75%B/B<sub>0</sub>のレベルで、両クリスタリンと比べ約2,000倍感度が低いものであった。このことは $\rho$ -クリスタリンとPGF合成酵素は、免疫学的に明らかに異なる蛋白質であることを示している。先の標準曲線を用いて粗抽出液中の $\rho$ -クリスタリン含量を求めると、全可溶性蛋白質の17.6%に達することが判明した（表1）。粗抽出液を直接Mono Sクロマトグラフで分析すると、RHO-I及びRHO-IIは2:3の割合で検出され、両クリスタリンは精製過程にできたartifactでないことが確認された。また、抗- $\rho$ -クリスタリンIgGを用いた吸収テストでは、少なくとも粗抽出液中のアルデヒド還元酵素活性、カルボニール還元酵素活性、及びPGE<sub>2</sub>還元酵素活性は全く吸収されないことより、 $\rho$ -クリスタリンのこれら酵素活性の欠如は精製過程に起きた失活でないことが示されている。

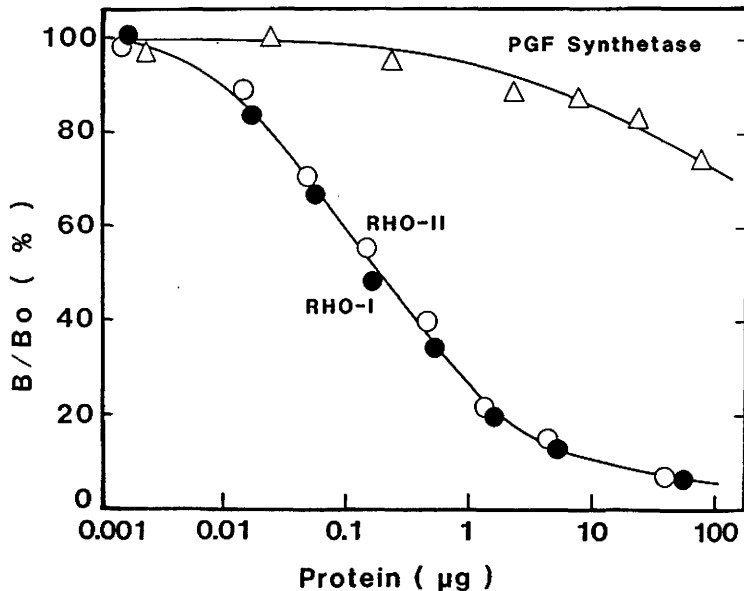


図7. RHO-I及びRHO-II、そしてPGF合成酵素のラジオイムノアッセイ。ウサギ抗- $\rho$ -クリスタリン抗血清と<sup>125</sup>I-ラベルRHO-Iを用いた。<sup>125</sup>I-ラベルRHO-IIでも同様の結果を得ている。



表1.  $\rho$ -クリスタリン (RHO-I 及びRHO-II) の精製。  $\rho$ -クリスタリンはラジオイムノアッセイ (図7) により定量した。

Purification steps	Protein	$\rho$ -crystallin		yield(%)	PGD, 11-keto-	PGE, 9-keto-	Carbonyl	Aldehyde
		mg	mg eq		mg eq/mg	reductase	reductase	reductase
					$\mu$ units	$\mu$ units	$\mu$ units	$\mu$ units
1. Crude extracts	888	157	0.176	100	3.19	15.0	6.300	1.270
2. Sephadex G-100	173	149	0.862	94.9	23.6	9.86	3.240	1.160
3. Red Sepharose								
Fraction A	65.4	63.9	0.978	40.7	7.45	5.58	1.160	443
Fraction B	65.9	65.8	0.998	42.0	9.78	1.69	978	219
4. First Mono S								
RHO-I	39.7	40.9	1.03	26.1	2.02	0.30	140	9
RHO-II	64.5	66.0	1.02	42.0	2.76	0.24	64	N.D.
5. Second Mono S								
RHO-I	29.0	29.0	1.00	18.5	N.D.	0.02	12	N.D.
RHO-II	44.2	44.2	1.00	28.2	N.D.	N.D.	6	N.D.

N.D. not detected (up to 0.3 mg of protein/ml of assay mixture for aldehyde reductase and carbonyl reductase; up to 2 mg of protein/ml of assay mixture for PGD, 11-ketoreductase and PGE, 9-ketoreductase)

RHO-I 及びRHO-II の構造特性を知る目的でこれらをEdman分解で分析した。RHO-I はEdman分解に抵抗し、従ってそのN末端はブロックされていると考えられる。一方、RHO-II のN末端アミノ酸配列はTLTKETRVTLNDGNMMPILGLGTYAAPDV……と決定された。Arginylendopeptidase 消化によるペプチドマップの結果では、SDS-PAGEで両クリスタリンは同じ分解パターンを示し、両者は蛋白質化学的に等しいと言える (図8)。

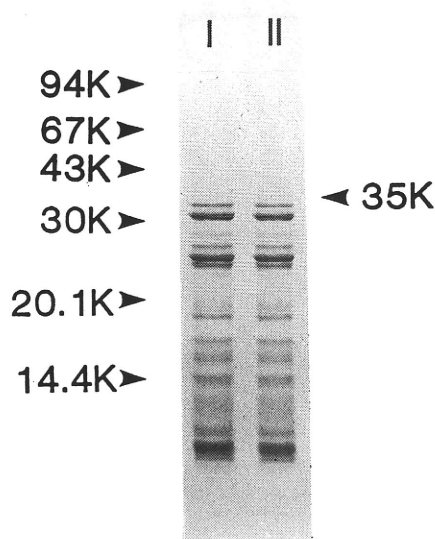


図8. Arginylendopeptidase によるRHO-I (I) 及びRHO-II (II) のペプチドマップ (SDS-PAGE)。

HPLCの上では両クリスタリンにそれぞれ特異的なペプチドI-8及びII-18が認められている (図9)。両ペプチドは共に等しいアミノ酸組成を示したが、I-8はEdman分解に抵抗し、他方II-18のアミノ酸配列はTLTKETRと決定されている。この後者の配列はRHO-IIのN末端配列に等しい。I-8はacylamino acid releasing enzymeで処理後LTKETRのアミノ酸配列が求められており、従って本ペプチドはII-18のN末端Thr残基がブロックされたものであると考えられる。また、それぞれのNo.のペプチドは等しいアミノ酸配列を示し両クリスタリンは一次構造上同等の蛋白質と結論される (図10)。RHO-IIのCNBr分解で得られたペプチドのアミノ酸配列分析から、今回新たに  $\rho$ -クリスタリンのN末端配列 (1~107残基) が決定された。この配列もPGF合成酵素と76%の高い相似性を示した。同様にアルデヒド還元酵素及びアルドース還元酵素とも高い相似性を示している。

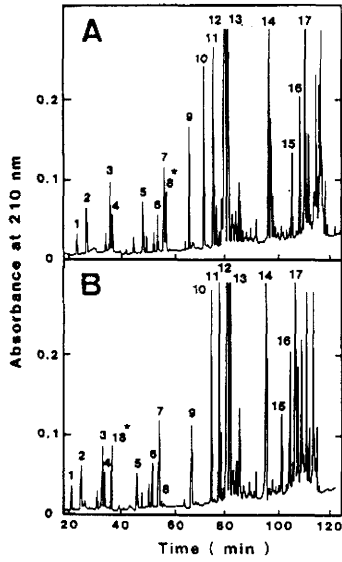


図9. (左) Arginyleptidase によるRHO-I (A) 及びRHO-II (B) のペプチドマップ (逆層HPLC)

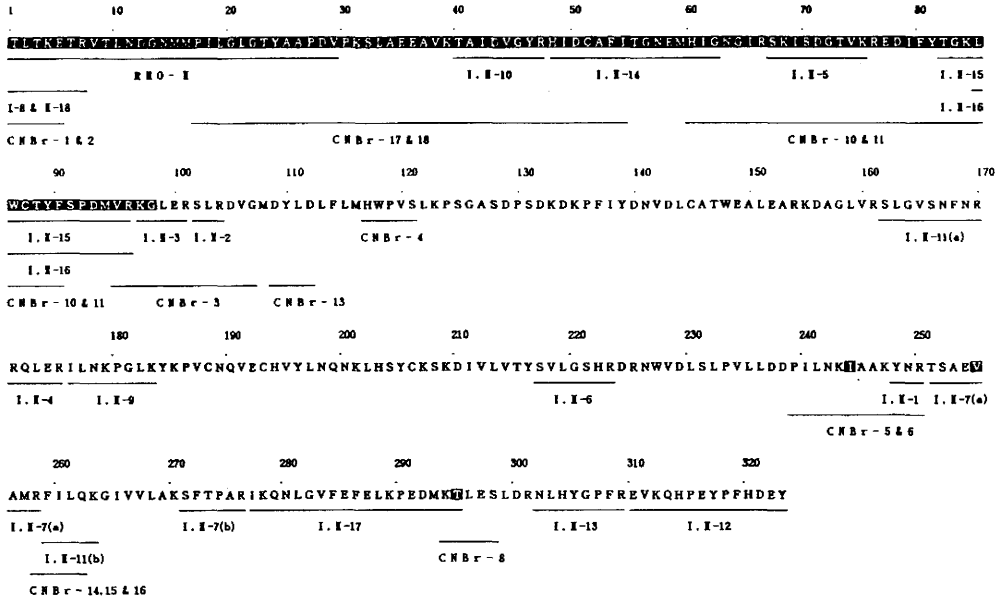


図10.  $\rho$ -クリスタリンの全一次構造の推定。白字は今回、藤井ら (13) が決定したアミノ酸配列、黒字は Tomarev ら (7) により決定されているアミノ酸配列。

両クリスタリンは共に NADPH の吸収スペクトルをレッドシフトさせるが (図11)、一方 NADH のそれは観察されなかった。NADPH の結合次数を求めると、両クリスタリン共0.75 モル/モル蛋白質となり、少なくとも1つの NADPH 結合部位を持っていることが確認された (図12)。その他、RHO-I 及びRHO-II の諸性質を表2にまとめて示した。

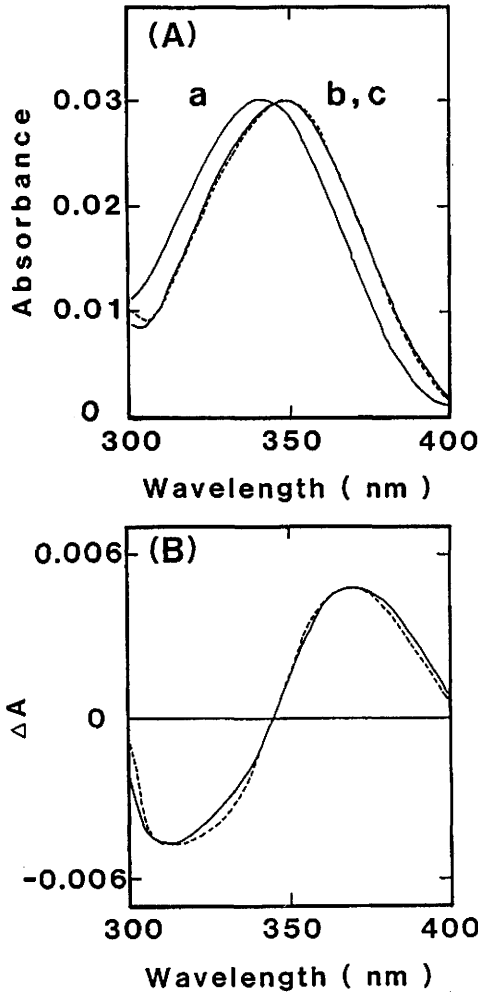


図11. RHO-I 及びRHO-II のNADPH結合能。NADPHの吸収スペクトル (A) ; a, 単独 ; b, +RHO-I ; c, +RHO-II。 (B) : RHO-I 結合型 (————)、或いはRHO-II 結合型 (-----) NADPHの差吸収スペクトル。

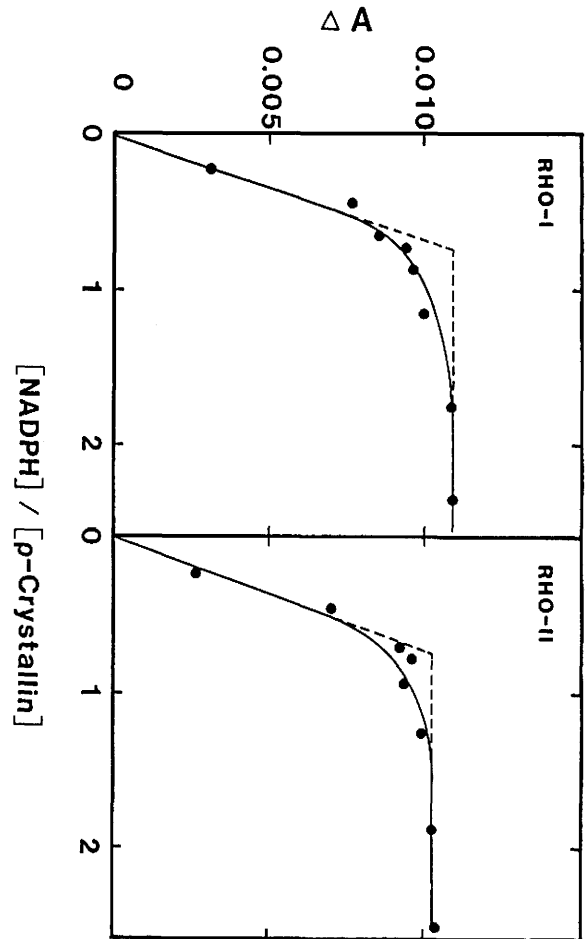


図12. RHO-I 及びRHO-II のNADPHによる分光学的滴定。 $\Delta A$ は差吸収スペクトルの370nmと310nmの吸光度差より求めた。

牛肺臓プロスタグランジンF合成酵素の全一次構造とカエル水晶体 $\rho$ -クリスタリンの精製並びにその性質

表 2. RHO-I 及びRHO-II の諸性質の比較。酵素活性はNADPH (0.2または0.5mM)、pH6.5で分光学的またはラジオケミカルに測定した。

	RHO-I	RHO-II
<b>Physicochemical property</b>		
molecular form	monomer	monomer
(M, by SDS-PAGE)	(35,000)	(35,000)
(M, by gel-filtration)	(30,000)	(30,000)
N-terminal amino acid	Thr	Thr
(blocking)	(acylation)	(free)
isoelectric point (pI)	8.05	8.15
shift of spectrum of cofactor(300-400nm)		
NADH	not observed	not observed
NADPH	red	red
(binding ratio of NADPH /mol of protein)	(0.75)	(0.75)
<b>Immunochemical property</b>		
anti- $\rho$ -crystallin antiserum	cross	cross
anti-PGF synthetase antiserum	no cross	no cross
<b>Enzymatic property<sup>1)</sup></b>		
<u>substrates</u>	<u>mM</u>	<u>munits/mg of protein</u>
PGH <sub>2</sub>	0.05	1.0 <sup>2)</sup>
PGD <sub>2</sub>	0.001-1.0	ND
PGE <sub>2</sub>	0.01	0.001
	0.1-1.0	ND
9,10-phenanthrenequinone	0.01	0.4
p-nitrobenzaldehyde	1.0	ND
DL-glyceraldehyde	10	ND
D-glucuronic acid	10	ND
D-glucose	100	ND
D-xylose	100	ND
menadione	0.1	ND
p-nitroacetophenone	1.0	ND
dihydroxyacetone	1.0-10	ND
succinic semialdehyde	1.45	ND
phenylglyoxal	1.0	ND
testosterone	1.0	ND
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1.0	ND

ND not detected (up to 2.0 or 0.3 mg of protein/ml of assay mixture for reduction of PGs or other compounds, respectively).

1) determined with NADPH as a cofactor by radiochemical and Spectrophotometrical methods described under "Materials and Methods" for reduction of PGs and other compounds, respectively.

2) used crystallins dialyzed against 10 mM sodium phosphate, pH 6.5.

## 3. 考察及び今後の展望

牛肺臓PGF合成酵素、人肝臓アルデヒド還元酵素、及びラット水晶体アルドース還元酵素は基質特異性や分子形態のみならず、一次構造の上でもアルド・ケト還元酵素スーパーファミリーの一員であると言える。従ってこれらの酵素は共通の祖先から進化してきた可能性を強く示唆するものである。これら種々のアルド・ケト還元酵素は色々の組織に広く分布し、それゆえ、これらの生理的意義は非常に重要なものと考えられる。しかし、未だそれらの役割について確固としたものが示されていない。今回、PG類に対する基質特異性が検討されたことは非常に有意義である。中でもPGH<sub>2</sub>はこれら3つの酵素の共通の基質の1つであることが判明した。生理活性物質であるPGF<sub>2</sub>αの生合成にアルド・ケト還元酵素は重要な位置を占めているかも知れない。一方、PGH<sub>2</sub>はエンドパーオキシド化合物であり、アルド・ケト化合物とは異なる。PGF合成酵素のPGH<sub>2</sub>結合部位は、アルド・ケト化合物であるPGD<sub>2</sub>の結合部位とは異なることが渡部らによって証明されている(2)。同様のことは、林らによって、人肝臓アルデヒド還元酵素でも認められている(11)。2種の異なるタイプの化合物が互いに異なる触媒様式で還元されるとすると、2つの結合部位を持っていることは不思議なことではない。しかし、酵素のドメイン説を考えると、分子量35,000前後の単量体酵素がさらに2つのNADPH結合部位を持っているのか?、という疑問が湧いてくる。人肝臓アルデヒド還元酵素のNADPHの結合次数は分光学的方法により、0.85モル/モル蛋白質と求められている(10)。このことから即、この酵素のNADPH結合部位は1つであると断定できないものの、その可能性は充分高いものと思われる。PGF合成酵素、並びにアルド・ケト還元酵素の反応機構を研究する上で、NADPHの結合次数の評価は重要である。今後、化学修飾法等の方法論を用いて検討したい。

ρ-クリスタリンは一次構造のみならず、分子形態やNADPH結合能(14)の点でもアルド・ケト還元酵素の一員であり、進化論的にはPGF合成酵素と同様のことが考えられる(13)。しかし、ρ-クリスタリンはPGF合成酵素様活性のみならずアルド・ケト還元酵素活性をも示さない。この酵素学的差異を説明できるいくつかの理由を考えてみたい。1つは活性部位(但し、NADPH結合部位は除く)に必須なアミノ酸残基の置換(或いは修飾)による不活性型への変換、2つ目の可能性は3次構造の不活性型への変換、3つ目の可能性は活性発現に必要な未知の因子の欠如等が考えられるのではないだろうか。図13に示したように、PGF合成酵素、アルデヒド還元酵素、及びアルドース還元酵素の間で保持され、ρ-クリスタリンのみ保持されていない幾つかのアミノ酸残基(△, ▲)が認められる。この内、特にThr-54(Tyrから)、Gly-107(Glnから)、Lys-135(Glyから)、そして、Val-195(Proから)の側鎖の性質には大きなひらきがある。従って、これらのアミノ酸残基が活性部位或いは3次構造に深く関わっている可能性は充分考えられる。

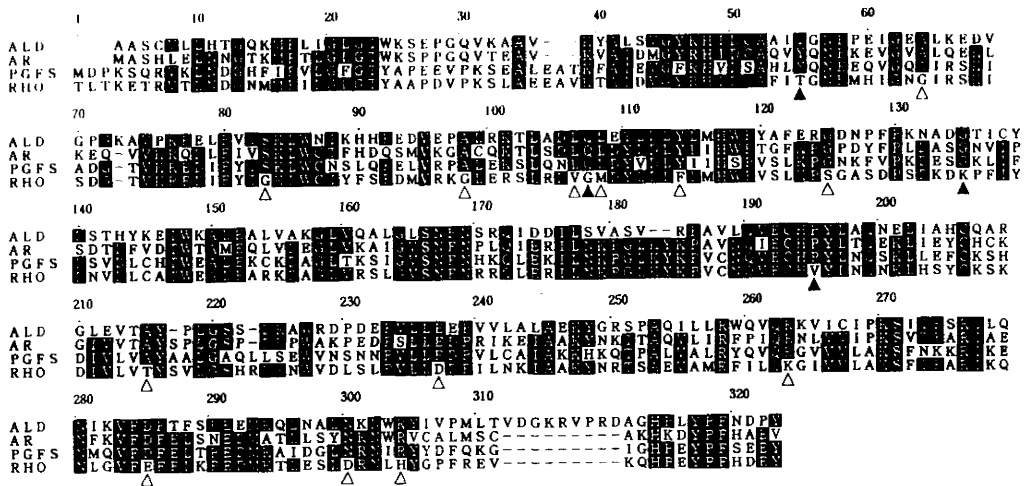


図13. アルド・ケト還元酵素と $\rho$ -クリスタリンの一次構造の比較。ALD, 人肝臓アルデヒド還元酵素；AR, ラットアルドース還元酵素；PGFS, PGF合成酵素；RHO,  $\rho$ -クリスタリン

水晶体蛋白質のタンオーバーは非常に遅いと考えられているので、クリスタリンの寿命は長く、古いものが多いと予想される。長い間に、 $\rho$ -クリスタリンは glycosylation 等の修飾を受ける可能性があり、このことが酵素活性や3次構造に関連していることも否定できない。他方、 $\rho$ -クリスタリンは、今回検討した基質以外に、全く別のものを基質とする可能性も依然残されている。 $\rho$ -クリスタリンの含量は全可溶性蛋白質の17.6%であり、密度的には53mg eq/g (レンズ湿重量) に達している。これらの値は、通常みられる酵素或いは蛋白質の含量及び密度をはるかに上回る高い値である。一般的に、水晶体蛋白質の密度は結晶蛋白質のそれに匹敵する程である。もし、 $\rho$ -クリスタリンが通常のタンオーバー数を持つ酵素であるならば、生理的酵素必要量をはるかに上回るのは当然といえよう。 $\rho$ -クリスタリンのPGH<sub>2</sub>還元活性がPGF合成酵素の僅か2%と低いのは、逆に、生理的に有意義なレベルのPGF<sub>2</sub> $\alpha$ の生合成にとって重要な意味をもつのかも知れない。

水晶体の機能として最も重要なことは可視光の透過を維持することである。上述のようにクリスタリン分子は非常に古い分子種であり、従って、高い熱力学的安定性が要求される。 $\rho$ -クリスタリンに観察されたNADPHの結合はまさにその安定性の向上に大きく寄与していると考えられる。即ち、一般的にNADPHのような低分子化合物が高分子である酵素と複合体を形成すると、その酵素の熱安定性が著しく向上するからである。アヒル水晶体の $\epsilon$ -クリスタリンは lactate dehydrogenase と同じ遺伝子産物である。 $\epsilon$ -クリスタリンはNADHと結合する能力を持っている。従って、 $\epsilon$ -クリスタリンの場合も $\rho$ -クリスタリンと同様の考察が可能であろう。おもしろいことに、同じ鳥類でもニワトリには $\epsilon$ -クリスタリンは発現されていない。カエルとアヒルは共に水辺に生息する生物である。水辺に生息する生物はニワトリ等の陸

性の生物よりも、水面から反射される紫外線による被爆量が多いと考えられる。NADHやNADPHは340nm付近の紫外線を良く吸収する。従って、角膜等で吸収できなかった340nm付近の紫外線をこれらの cofactorがトラップし、エネルギーをクリスタリンへ渡し、最終的に熱エネルギーとして外部へ放出することで目を紫外線障害から保護していると考え、非常に興味深いものになる。

最後に、渡部紀久子、林秀也、倉光成紀、裏出良博の各博士との共同研究にて成果を得ることができました。ここに深く感謝致しますとともに、有意義なご意見、ご助力を得ました早石修、鏡山博行、武居順子、伊藤誠二、根岸学の各先生および早石プロジェクトの皆様、ならびに本学の中井昇教授、脇屋和美氏および関係各位の皆様には厚くお礼申し上げます。

#### 4. 参考論文

- 1) Watanabe, K., Shimizu, T., and Hayaishi, O. (1981) Biochem. Int. **2**, 603-610.
- 2) Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T., and Hayaishi, O. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 7035-7041.
- 3) Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1987) Science **236**, 1554-1556.
- 4) Wistow, G. J., Mulders, J.W.M., and de Jong, W.W. (1987) Nature **326**, 622-624.
- 5) Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1988) Ann. Rev. Biochem. **57**, 479-504.
- 6) Piatigorsky, J., and Wistow, G.J. (1989) Cell **57**, 197-199.
- 7) Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., Dolgilevich, S. M., Luchin, S. V., Krayev, A. S., Skryabin, K. G., and Gause, G. G. (1984) FEBS Lett. **171**, 297-302.
- 8) Watanabe, K., Fujii, Y., Nakayama, K., Ohkubo, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Nakanishi, S., and Hayaishi, O. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 11-15.
- 9) Caper, D., Nishimura, C., Shinohara, T., Dietzchold, B., Wistow, G., Craft, C., Kador, P., and Kinoshita, J. H. (1987) FEBS Lett. **220**, 209-213.
- 10) Wermuth, B., Münch, J. D. B. and Wartburg, J. P. (1977) J. Biol. Chem. **252**, 3821-3828.
- 11) Hayashi, H., Fujii, Y., Watanabe, K., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 1036-1040.
- 12) Watanabe, K., Fujii, Y., Hayashi, H., and Hayaishi, O. (1989) in preparation.
- 13) Fujii, Y., Watanabe, K., Hayashi, H., Urade, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., and Hayaishi, O. (1990) J. Biol. Chem. in press.
- 14) Carper, D. A., Wistow, G., Nishimura, C., Graham, C., Watanabe, K., Fujii, Y., Hayashi, H., and Hayaishi, O. (1989) Exp. Eye. Res. **49**, 377-388.