

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ー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	http://hdl.handle.net/10098/5357

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 ー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.: <u>Porc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 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 $\rho - \rho$ リスタリンは現在までにその C末端側約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 ρ - ρ 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 ρ - ρ 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、 ρ - ρ 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PGH₂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 PGD₂やPGE₂をも基質としなかった。従って、酵 素学上 ρ - ρ リスタリンはアルド・ケト還元酵素と異なる。 ρ - ρ 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 ρ 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量をはるかに越えるものと考えられる。しかし、 PGH₂から生理活性物質であるPGF₂ 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 れることがなく、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、 $\rho - \rho$ 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PGD₂よりPGF₂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 PGD₂から9 α ,11 β -PGF₂の、またPGH₂からPGF₂ 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 ものがない。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決なもの 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Sm-クリスタリンは、 それぞれ lactate dehydrogenase、arginosuccinate lyase、enolase、そして glutathione Stransferase 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:lle-Lys²-Glu-Asn-Met-Gln-Val⁷-Phe-Asp-Phe-Glu-Leu-Thr-Pro¹⁴-Glu-Asp-Met-Lys¹⁸。 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

-52-

牛肺臓プロスタグランジンF合成酵素の全--次構造とカエル水晶体 ρ-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。

> Met Asp Pro Lys Ser Gin Arg Val Lys Leu A:... nop Giv Mis Phe 11e Pro Val Leu Giv Phe Giv Thr Tyr Ala Pro Giu 5'---CAAACA AUG GAU CCC AAA AGU CAG AGG GUG AAG CUU AAU GAU GAC CAC UUC AUU CCU GUC CUG GGA UUU GGA ACC UAU GCA GIU VAI Pro Lys Ser GIU AIA LEU GIU AIA THE LYS PHE AIA FIE GIU VAI GIY PHE Arg HIS VAI ASD Ser AIA HIS LEU TYT GIN ASM GAG GUU CCU AGG AGU GAA GCC CUG GAG GCC ACC AAA UUU GCU AUA GAG GUU GGG UUC CGC CAU GUG GAC AGU GCU CAU UUG UAU CAA AAU GIU GIU GIN VAL GIV GIN ATA ILE AND SEN LYS ILE ATA ASD GIV THY VAL LYS AND GIU ASD ILE PHE TYY THY SEN LYS LEU TYP CYS GAG GAG CAG GUU GGC CAG GCC AUU CGA AGC AAG AUU GCA GAU GGC ACU GUG AAG AGA GAA AGA AUA UUC UAC ACU UCA AAG CUU UGG UGC Asm Ser Leu Gin Pro Giu Leu Val Arg Pro Ala Leu Giu Lys Ser Leu Gin Asm Leu Gin Leu Asp Tyr Val Asp Leu Tyr lie fie His Anu UCC CUU CAA CCA GAG UUG GUC CGA CCA GGC UUG GAA AAG UCA UUG CAA AAU CUU CAA CUG GAC UAU GUC GAU CUC UAU AUU AUU CAU Ser Pro Val Ser Leu Lys Pro Gly Asn Lys Phe Val Pro Lys Asp Glu Ser Gly Lys Leu Ile Phe Asp Ser Yal Asp Leu Cys His Thr UCU CCA GUG UCU CUG ANG CCA GGG ANU ANA UUU GUU CCA ANA GAU GAA AGU GGA ANA CUG AUA UUU GAC UCG GUG GAU CUC UGU CAC ACG 420 T<u>ro Giu Ala Leu Giu Lys</u> Cys Lys Asp Ala Giy Leu Thr Lys Ser Ile GLy Val Ser Asn Phe Asn His Lys Gin Leu Giu Lys Ile Leu UGG GAG GCC CUG GAG AAG UGU AAG GAC GCA GGG CUG ACC AAG UCC AUU GGG GUG UCC AAC UUC AAC CAC AAG CAG CUG GAG AAG AUC CUG Asn Lys Pro Gly Leu Lys Tyr Lys Pro Val Cys Asn Gln Val Glu Cys His Pro Tyr Leu Asn Gln Ser Lys Leu Leu Glu Phe Cys Lys AAC AAG CCG GGG CUC AAG UAC AAG CCC GUC UGC AAC CAG GUG GAA UGU CAC CCU UAC CUC AAC CAG AGC AAA CUG UUA GAG UUC UGC AAG 220 Ser His Asp île Val Leu Val Ala Tyr <u>Ala Ala Leu Giy Ala Gîn Leu Leu Ser Giu Trp Val Asn Ser Asn Asn Pro Val Leu Leu</u> Giu UCA CAU GAU AUU GUC CUA GUU GCU UAU GCU GCU CUG GGA GCC CAA CUA UUG UCA GAA UGG GUG AAC UCA AAC AAC CCC GUU CUC UUG GAG 660 250 ASP Pro Val Leu Cys Ala The Ala Lys Lys His Lys Gin Thr Pro Ala Leu Val Ala Leu Arg <u>Tyr Gin Val Gin Arg</u> Giy Val Val Val GAC CCG GUU CUU UGU GCC AUU GCC AAA AAG CAC AAG CAA AGC CCA GCU CUG GUU GCC CUU GCC UAC CAG GUA CAA CGU GGA GUU GUG GUU 780 720 Leu Ala Lys Sar Phe Asn Lys Lys Arg <u>Ile Lys Glu Asn Met Gln Yal Phe Asp Phe Glu Leu Thr Pro Glu Asp Met Lys</u> Ala Ile Asp Cub GCC AAG AGU UUC AAC AAG AAG AGG AUC AAA GAG AAU AUG CAG GUS UUU GAC UUU GAA CUG ACU CCG GAA GAU AUG AAA GCA AUC GAU RAO 310 Gly Leu Asn Arg Asn Ile Arg Tyr Tyr Asp Phe Gln Lys <u>Gly Ile Gly His Pro Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Glu Tyr</u> GGC CUC AAU CGU AAU AUA AGA UAC UAU GAU UUU CAA AAG GGU AUU GGU CAC CCU GAG UAC CCA UUU UCU GAA GAA UAU SAGCU 920 GUCCACCAUGGCUUCUACCI UUCUAGGGCUACG ***** 1000 1070 1040 1060 1080 1100 AAAGAUAACUUGGUUAACUUACUU UCUUUAUGAAAUAACCAAGAUHUCAAAUAUGGGUACUAGUUUUUCCUAACAAAAUAAUUUGAAAAAUAAGGGAAAAGAUAGAAA 1120 1140 1160 1180 1200

Primary structure of buvine 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 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

藤井 豊

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AR	AASCVLLHTGOK	MPLIGLGTWK : :: :	SEPGOVKAAV		YRHIDCAAI	YGNEPĖIGEAL	KEOVĠPGKAN : :: :	/PREELFVTSK	LWNTKĤHPED	VEPALR
PS	MOPKSQRVKLNDGHF	IPVLGFGTYA	PEEVPKSEAL	EATKFAIEW	FRHVDSAHL	YQNEEQVGQAI	RSKIADG-T	KREDIFYTSK	LWCNSLQPEL	VRPALE
EC										LE
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AR	KTLADLQLEYLDLYU	MHNPYAFERG : :	DNPFPKNADG : :	TICYDSTHYI ::!!	ETWKÁLEAU	VAKGLVQALGL	SNFNSRQIDO	DILSVASVF	IPAVLOVECHP	YLADŘ 11 1
PS	KSLQNLQLDYVDLYI	INSPV\$LKPG : :	NKFVPKDESG	KLIFDSVOL	CHTWEALEKO	KDAGLTKSIGV	SHFNHKQLE)	KILNKPGLKYK :11111111111	(PVCNQVECHP	YLNQS
EC	RSLROVGMOYLOLFU	MMPVSLKPS	GASOPSOKOK	PFIYDNVDLO	ATWEALEAR	KDAGLVRSLGV	SAFARROLE	RELINKPGLKYK	PVCHQVECHV	YLNQN
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AR	ELIAHCOARGLEVTA	Y-PLĠSS-DR : :	AWRDPDEPVL	LEEPVVLAU	EKYGŔSPAQ	ILLRNÖVORKV	1C1PKS1TP : ::	SRILQNIKVFO 11:1:11	FTFSPEEMKO	LNALN
P\$	KLLEFCKSHDIVLVA	YAALGAQLLS	EWVNSNNPVL	LEDPVLCAT	KKHKQTPAL	VALRYQVQRGV	VVLAKSFNK)	KRIKENHOVFC	FELTPEDMKA	IDGLN
EC	KLHSYCKSKDIVLVT	YSVLGSHRDR	NWVDLSLPVL	LOOPILNKV	AKYNRTSAE	TAMRFILQKGI	VVLAKSFTP/	ARIKQHLGVFE	FELKPEDMKS	LESLD
	310	320								
AR	KNWRYIVPHLTVDGK	RVPRÖAGHPL	YPFNDPY							
PS	RNERYYDFOKGIGHP	EVPESEEV								
EC	RNLHYGPFREVKQHP	EYPFHOEY								

Comparison of PGF synthase (PS) with human liver aldehyde reductase (AR) and European common frog lens ε -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ρークリスタリン(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ュを良い基質としなかったが、PGHュを還元しPGFュαを 生成することが明らかにされた。PGH₂に対するKm 値は100µMとPGF合成酵素のそれ(10 μΜ)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PGH₂を還元してPGF₂αを生成することも知られている(12)。 PGH₂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、PGF2 a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(Eeuropean common frog (Rana temporaria))水晶体の $\rho - \rho$ 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、 $\rho - \rho$ 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)。 ρ – 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-phenanthreneqinone(10μM)を用いてカルボニール還元酵

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ρークリスタリンの精製並びにその性質

素、p-nitrobenzaldehyde(1mM)を用いてアルデヒド(又はアルドース)還元酵素、PGD₂ (1 μM)を用いてPGF合成酵素、そしてPGE₂(0.1mM)を用いてPGE₂9-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ρ-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によるゲルロ過で抽出蛋白質は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 ρーク リスタリンも同じ位置に溶出され、ゲルロ過での分子量は約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ρ-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ρ-クリスタリンが単一のもの で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、ρ-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。ρ-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PGE₂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 MonoS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ρ-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)。

藤井

豊



20

Fraction Number

40

60

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の一クリスタリンの精製並びにその性質

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 PGE₂ 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 DLglyceraldehyde、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PGH₂ 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 $\rho - \rho$ リスタリンの抗体を調整し、RHO-I及びRHO-I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/B₀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 $\rho - \rho$ 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 $\rho - \rho$ 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MonoS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中にできたartifactでないことが確認された。また、抗- $\rho - \rho$ 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の欠如は精製過程中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 PG F 合成酵素のラジオイ ムノアッセイ。ウサギ 抗ー ρ – クリスタリン 抗血清と¹²⁵ I – ラベ ルRHO – Iを用いた。 ¹²⁵ I – ラベルRHO – II でも同様の結果を得 ている。

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

Purification steps	Protein	<i>p</i> − crys tallin		PGD: 11-keto- PGE: 9- reductase reduct		Carboay1 reductase	bonyl Aldehyde luctase reductase	
	MC.	mg eq	ng eq/ng	yield(%)	#units	munits	munits	munits
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-1	39.7	40.9	1.03	26.1	2.02	0.30	140	9
RHO-11	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-I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、RH O-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)。他方、逆層



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 $\rho - \rho \cup \neg \rho \cup \neg \rho \cup \neg \rho$ (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) Arginyledopeptidase によるR HO-I (A) 及びRHO-II (B) のペプ チドマップ (逆層HPLC)



図10. ρ-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-I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。△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ρー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			
Physicochemical property						
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 cofac	tor(300-400nm)					
NADH		not observed	not observed			
NADPH		red	red			
(binding ratio of NADPH		(0.75)	(0.75)			
/mol of protein)						
Immunochemical property						
anti-p-crystallin antiser	um	cross	cross			
anti-PGF synthetase antise	rum	no cross	no cross			
Enzymatic property ¹⁾						
substrates	<u>mM</u>	munits/mg of protein				
PGH₂	0.05	1.0*)	0.92)			
PGD:	0.001-1.0	ND	ND			
PGE 2	0.01	0. 001	ND			
	0.1-1.0	ND	ND			
9.10-phenanethrenequinone	0. 01	0.4	ND			
p-nitrobenzaldehyde	1.0	ND	ND			
DL-glyceraldehyde	10	ND	ND			
D-glucuronic acid	10	ND	ND			
D-glucose	100	ND	ND			
D-xylose	100	ND	ND			
menadione	0.1	ND	ND			
p-nitroacetophenone	1.0	ND	ND			
dihydroxyacetone	1.0-10	ND	ND			
succinic semialdehyde	1.45	ND	ND			
phenylglyoxal	1.0	ND	ND			
testosterone	1.0	ND	ND			
K,Fe(CN),	1.0	ND	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).

 determined with NADPH as a cofactor by radiochemical and Spectrophotometical 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.

藤井 豊

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PGH₂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PGF₂α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、PGH₂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PGH₂結合部位は、アルド・ケト化合物であるPGD₂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き、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NADP H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。

 $\rho - \rho$ 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、 $\rho - \rho$ 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転換、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、 $\rho - \rho$ 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 係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ρー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,ρークリスタリン

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、 $\rho - \rho$ 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、 $\rho - \rho$ 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。 $\rho - \rho$ 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、 $\rho - \rho$ 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。 $\rho - \rho$ リスタリンのPGH2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PGF2 a 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NA DPH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ると、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.
- Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T., and Hayaishi, O. (1985) <u>J. Biol. Chem. 260</u>, 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) <u>Ann. Rev. Biochem</u>. 57, 479-504.
- 6) Piatigorsky, J., and Wistow, G.J. (1989) Cell 57, 197-199.
- Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., Dolgilevich, S. M., Luchin, S. V., Krayev, A. S., Skryabin, K. G., and Gause, G. G. (1984) <u>FEBS Lett</u>. 171, 297-302.
- Watanabe, K., Fujii, Y., Nakayama, K., Ohkubo, H., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Nakanishi, S., and Hayaishi, O. (1988) <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 85, 11-15.
- 9) Caper, D., Nishimura, C., Shinohara, T., Dietzchold, B., Wistow, G., Craft, C., Kador, P., and Kinoshita, J. H. (1987) <u>FEBS Lett.</u> 220, 209-213.
- Wermuth, B., Münch, J. D. B. and Wartburg, J. P. (1977) <u>J. Biol. Chem.</u> 252, 3821-3828.
- Hayashi, H., Fujii, Y., Watanabe, K., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1989) J. <u>Biol.</u> <u>Chem.</u> 264, 1036-1040.
- 12) Watanabe, K., Fujii, Y., Hayashi, H., and Hayaishi, O. (1989) in preparation.
- Fujii, Y., Watanabe, K., Hayashi, H., Urade, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., and Hayaishi, O. (1990) <u>J. Biol. Chem</u>. in press.
- 14) Carper, D. A., Wistow, G., Nishimura, C., Graham, C., Watanabe, K., Fujii, Y., Hayashi, H., and Hayaishi, O. (1989) <u>Exp. Eye. Res. 49</u>, 377-388.

-64 -