

れることが広く知られている⁴⁾。これと同様な機構で、心臓血管系^{5,6)}、胃腸系^{7,8)}、泌尿生殖器系⁹⁾組織においてOH-CblがNOの生理活性を阻害することすなわち、NOによる平滑筋弛緩作用の阻害で検討されている。その結果、OH-Cblは外在性NOの作用は顕著に阻害するが、神経系により生じた内在性NOの作用に対しては阻害効果が低いとする報告⁹⁾や外在性と内在性NOの作用を同様に著しく阻害するとする報告¹⁰⁾もあり、一様でない。また、NOによるHL60細胞の増殖阻害作用をOH-Cblは顕著に阻害するとも報告されており¹¹⁾、これらNOの生理活性阻害は、すべてOH-CblのNOスキベンジャーとしての作用によっている。以上の結果から、最近のNO研究においてOH-Cblは特異的NOスキベンジャーとして、NOを介した種々の生理現象解明のための道具として使われている¹²⁾。

Brouwerらは¹¹⁾生体に存在する種々のCbl同族体にNOを作用させ、NO-Cblの生成を検討した。その結果、OH-Cbl(またはアクアコバラミン)のみがNO-Cblを生じた。このNO-Cblはとても安定であり、NO-CblのNOはヘモグロビンやグルタチオンへ転移することができた。また、NO-CblはOH-Cblに比べメチオニン合成酵素において補酵素として供給され難い性質を有していることも報告している。Nicolaouらも¹³⁾NOによるメチオニン合成酵素活性の阻害(IC₅₀=3 μmol/l)を報告しており、これが生体内ホモステインレベルを上昇させることで心臓血管系疾病との関連を指摘している。また、Brouwerらは¹¹⁾ある種の疾病において内在性NOが過剰に産生されることや疾病治療のために外在性NO(NO産生剤)の投与が一般化するなかで、生体内でのNOとCblの相互作用の重要性を認識することが必要であり、NO-Cbl生成による局所的Cbl機能障害の可能性を指摘している。

(高知女子大 家政 渡辺文雄)

文 献

- Williams, H., Johnson, D. J., McNeil, J. S., Wright, D. G.: J. Lab. Clin. Med., **116**, 37-44 (1990)
- Houeto, P., Hoffman, J. R., Imbert, M., Levillain, P., Baud, F. J.: Lancet, **346**, 605-608 (1995)
- Houeto, P., Borron, S. W., Sandouk, P., Imbert, M., Levillain, P., Baud, F. J.: Clin. Toxicol., **34**, 397-404 (1996)
- Gibson, A., Lilley, E.: Gen. Pharmac., **28**, 489-493 (1997)
- Rajanayagam, M. A. S., Li, C. G., Rand, M. J.: Br. J. Pharmacol., **108**, 3-5 (1993)
- La, M., Li, C. G., Rand, M. J.: Br. J. Pharmacol., **117**, 805-810 (1996)
- Lefebvre, R. A.: Br. J. Pharmacol., **118**, 2171-2177 (1996)
- Jenkinson, K., Reid, J., Rand, M. J.: Eur. J. Pharmacol., **275**, 145-152 (1995)
- La, M., Paisley, K., Martin, W., Rand, M. J.: Eur. J. Pharmacol., **321**, R5-R6 (1997)
- Lilley, E., Gibson, A.: Br. J. Pharmacol., **119**, 432-438 (1996)
- Brouwer, M., Chamulitrat, W., Ferruzzi, G., Sauls, D. L., Weinberg, J. B.: Blood, **88**, 1857-1864 (1996)
- Foresti, R., Clark, J. E., Green, C. J., Motterlini, R.: J. Biol. Chem., **272**, 18411-18417 (1997)
- Nicolaou, A., Kenyon, S. H., Gibbson, J. M., Ast, T., Gibbson, W. A.: Eur. J. Clin. Invest., **26**, 167-170 (1996)

酵母のペルオキシソームに存在する アスパラギン酸アミノ基転移酵素は シトソール型アイソザイムである

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) にはシトソール型アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (cAAT) とミトコンドリア型 (m)AAT をコードする遺伝子が存在する。オレイン酸のような脂肪酸を炭素源として酵母を培養すると、大量のペルオキシソームを合成する。この中に多量の AAT が局在するにもかかわらず、このペルオキシソーム型 AAT をコードする遺伝子は見いだされていない。最近、このペルオキシソーム中に存在する AAT がシトソール型酵素と同一であり、シトソールから移行していることが示された。しかもペルオキシソーム中の AAT は、マレート/アスパルテートシャトルとしての機能を果たしていないことが示唆された¹⁾。

酵母をオレイン酸を炭素源とする培地で培養し、酵母細胞からオルガネラを分画し、AAT 活性を測定したところ細胞内全活性の85%以上がオルガネラ画分に存在し、その内の大部分がペルオキシソーム中に存在していた。そして、ミトコンドリア中にはごくわずかしか見いだされなかった。

cAAT をコードする遺伝子、AAT2 をクローニングし、構造を決定したところ従来アミノ末端と考えられていた Met のアミノ末端側に14残基のアミノ酸をコードするフラグメントが結合しており、長短二種類の cAAT が翻訳されている可能性のあることがわかった。また、カルボキシル末端に Ala-Lys-Leu という peroxisomal targeting signal (PTS) が存在するこ

とが確認された。なお、このカルボキシル末端の配列は動・植物や大腸菌の AAT には認められない。

この AAT2 遺伝子を破壊した変異株 ($\Delta aat2$ 変異株) が得られた。この株はオレイン酸、グリセロール、酢酸、グルコースのいずれを炭素源にしても同様によく増殖できたが、全 AAT 活性は、野性株に比べ、0.5%以下に低下していた。すなわち、この変異株も野性株と同様に、mAAT 活性が非常に低いことになる。酵母にはミトコンドリア型 AAT の遺伝子が存在しているが、この遺伝子産物の生成量はミトコンドリアが大量に生合成される条件下でも非常に少ないことはわれわれも観察している。この mAAT 遺伝子の発現の有無と調節機構に関しては今後解明されなければならない。

この $\Delta aat2$ 変異株は Asp 要求性となり、ペルオキシソーム中に AAT 活性はほとんど認められなくなったものの、オレイン酸培地で正常に増殖し、パルミチン酸の β 酸化活性も野性株と同じレベルであった。したがって、AAT2 は脂肪酸の β 酸化に必要ではなく、おそらくは、マレート/アスパルテートシャトルの構築に関与していないと思われた。この変異株のミトコンドリア中の AAT 活性は野性株と同様非常に低いものの、ミトコンドリアのマーカー酵素と同位置にピークを示した。しかしながら、上述のごとく、このミトコンドリア内の活性は、マレート/アスパルテートシャトルを構成しているとは考えられないほど低いものであった。

ペルオキシソームへ AAT2 を輸送するレセプターの種類が変異株を用いて調べられた。AAT2 は 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素と同じく PTS1 を持つタンパク質の受容体によりペルオキシソームへ輸送されることがわかった。

全 AAT 活性と AAT2 の mRNA は共にオレイン酸によって誘導されることはなく、オレイン酸を炭素源としてペルオキシソーム中の活性が上昇するのはシトソールからペルオキシソームへ AAT2 が移行するためであることが示唆された。オレイン酸培地とグルコース培地の酵母のオルガネラ画分中の AAT 活性はそれぞれ85%と16%であった。また、ペルオキシソームを合成できない変異株では、オレイン酸培地でも74%の活性がシトソールに存在した。これらの結果は生菌体を用いた実験で確認された。すなわち、これら2種の炭素源で培養した野性株菌体を各種濃度のジギトニンで処理し、菌体外へ漏出される AAT 活性を測

定すると、グルコース培地の菌体とペルオキシソームを合成できない変異株のオレイン酸培養菌体からは、低濃度のジギトニンで、シトソール局在のマーカー酵素と同じように AAT が漏出された。一方、オレイン酸培地の野性株菌体からは、ペルオキシソーム局在の酵素と同様に、より高濃度のジギトニン存在下でしか漏出しなかった。

グルコース培地の酵母で、ペルオキシソームに AAT が移動しない理由として、PTS1 輸送系が機能していない可能性が考えられた。しかしながら、レクチンをタグとして結合させた PTS1 レポータータンパク質 (マレート脱水素酵素 3) がグルコース培養菌体でペルオキシソーム中に局在することが免疫電子顕微鏡法により確認され、この可能性は否定された。

さらに、AAT2 遺伝子から長短2種類の AAT タンパク質が合成されうるため、この違いによってペルオキシソームへの移行が調節されている可能性が考えられた。そこで、 $\Delta aat2$ 変異株に長短2種の AAT2 遺伝子の発現ベクターを入れ、オレイン酸培地で培養すると、長さに関係なく、ほぼ同じ AAT 活性がペルオキシソーム中から見いだされた。従って、アミノ末端配列の違いによってペルオキシソーム中への移行が調節されているとは考えられなかった。

AAT は動物ではシトソールとミトコンドリアに局在するのみであるのに対し植物ではこれらに加えて、ペルオキシソームやクロロプラストにも局在する²⁾。一般的に、これらのオルガネラに局在する AAT はマレート/アスパルテートシャトルを構成して機能を果たすと考えられてきた。しかしながら、ミトコンドリア以外のオルガネラで実際にこの機能を果たしていることを示すデータが得られている場合は少ない。酵母のペルオキシソームに局在する AAT の生理機能の解明が待たれる。

(高知大農 生物資源科学 八木年晴)

文 献

- 1) Verleur, N., Elgersma, Y., Van Roermund, C. W. T., Tabak, H. F., Wanders, R. J. A.: Eur. J. Biochem., **247**, 972-980 (1997)
- 2) Schultz, C. J., Coruzzi, G. M.: Plant J., **7**, 61-75 (1995)

肺癌に有効な新規レチノイド関連分子

肺癌によって日本では年間4万人、アメリカ合衆国