Mevalonic acid dehydrogenase の性状について

中 村 治 雄*

1. 緒 論

コレステロールの生合成において mevaldic acid (MALD) および mevalonic acid (MVA) の作用はきわめて重要な位置を占めている。すなわち一般に酢酸からは、酢酸→アセト酢酸→ β -hydroxy- β -methylglutaric acid (HMG)→MALD→MVA→スクワレン→コレステロールとなる。飢餓動物^{1,2,3)}の肝では酢酸からコレステロールへの incorporation が阻害されるが、MVA からののはあまり阻害されない。したがって飢餓動物の肝のコレステロール生合成の低下は MVA よりの生合成が阻害されることによるのではない。その他サイロキシン⁴⁾、ニコチン酸⁵⁾、X 線照射⁶⁾、Mer-29⁷⁾などの多数のコレステロールの生合成の報告により MALD および MVA の両者はコレステロール生合成への中核をなすものである。著者⁸⁾は各種の腹水ガン細胞のコレステロールの生合成においてエールリックの腹水ガン細胞のみは酢酸からも、MVA からもその合成能はきわめてわるく、その主なる道程は MVA からの道程に障害があると報告した。

mevalonic acid dehydrogenase は肝の抽出物では DPNH、酵母の抽出物では TPNH の存在の下で MALD を MVA にかえる。この酵素は最初 Lynen⁹⁾により酵母、ついで Coon ら¹⁰⁾により豚の肝、心、腎より分離されたがその生物学的性状は明らかでない。またネズミの肝よりの分離についてはまだ報告されていない。

そこでその定量の一段階として分離精製を企て、もつて定量への糸口を開きコレステロール生合成の代謝の一面を明らかにせんとして DEAE-

cellulose column を用い酵素を分離し、その性状について報告する。

2. 実験方法および成績

a. 実験材料

DL-mevalonic acid は dibenzylethylene diamine salt (DBED), DL-mevaldic acid は acetal 型、また DL-mevalonic acid-2-C¹⁴ は DBED 塩で MALD acetal は実験前 Shunk¹¹⁾の方法により 0.1 N HCl で 25 分加水分解し MALD とした。また MVA はアンモニア処理後エーテルで DBED 塩を抽出除去した。蛋白濃度はベックマン分光光度計を用い、280 m μ と 260 m μ の両者の測定値より算出¹²⁾し、ホモジネートの場合はビウレット法により測定した¹³⁾。

b. 酵素量の測定

DPNH が DPN となるために生ずる 340 m μ での optical density の減少より測定し、反応液は MALD 5 μ moles, 磷酸カリ緩衝液 (pH 6.2) 200 μ moles, DPNH 0.4 μ moles, EDTA 10 μ moles および酵素液を加え全量 3.3 ml とした。対照には MALD を加えない。酵素の活性は 30°C で 340 m μ で 1 分内に 0.001 の optical density の変化を 1 単位とし、その specific activity は酵素蛋白 1 mg についての単位としてあらわした。分光光度計の読は 30 秒ごとに 3~5 分 30°C で測定した。

c. 酵素の分離

成熟 Long-Evans のオスのネズミを断頭し、ただちに肝をとり、冷水で洗い、小切片となし、冷 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.5, 5 $\times 10^{-3}$ M の EDTA を含む) の 10 倍液で 4°C で 30 秒内 Waring blender でホモジネートした。

このホモジネートを 13000 $\times$ g 30 分遠心し、この上清に固形硫酸アンモンを少量ずつ絶えず攪拌しながら 45% 飽和にし (277 g/l)¹⁴⁾、3 時間放置後 13000 $\times$ g で遠心し沈殿物および上清を得る。この上清に 75% 飽和硫酸アンモンになるとく加え (210 g/l)、4 時間放置

* H. Nakamura (助教授): 北海道大学第一生理学教室。

図 1. 酵素の DEAE-cellulose による分離

表 1. 酵素分離の各段階の活性

	Total activity (Units)	蛋白 (mg)	Specific activity	収量 (%)
ホモジネート	1,040	2×10^3	0.52	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分画	630	3×10^2	2.1	60
DEAE-cellulose クロマトグラフィー	195	1.5	130	19

後、遠心し、沈殿物は 0.1 M 磷酸カリ緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、この液を 10 時間 0.005 M 磷酸カリ緩衝液 (pH 7.5) で透析し、13000 $\times$ g 30 分で生じた沈殿物を除去した。かくして透明な上清を得る。これを DEAE-cellulose column にかけた。

DEAE-cellulose column は Peterson-Sober¹⁵⁾ の方法を用い、操作はすべて 3°C の低温室で行なつた。column は 45 $\times$ 2.5 cm で 28 g の DEAE-cellulose を用い、column はまず使用前 pH 7.5 の 0.005 M の磷酸緩衝液で十分洗い、ついで 300 mg の蛋白を含む試料を 1 分間に 2 ml の速さで column を通過さす。

流出液は自動分画装置で 10 ml ごとにとる。最初に 0.005 M 磷酸カリ緩衝液 pH 7.5 で行ない、ついで図 1 のごとく濃度と pH をかえて行なつた。

酵素は一つのピークとしてあらわれたが、その両端にもすこし存在した。この一番高い活性を有する分画について以下の性質をしらべた。この分画は低温下で濃縮

図 2. 酵素濃度と活性度

図 3. Ph 活性度曲線

し、-30°C に保存する。表 1 に酵素の分離の段階の成績を示す。

d. 酵素の性状

濃度と活性は図 2 のごとく直線をなす。また pH の最適は図 3 のごとく 6.2 であり、また Michaelis の恒数は図 4 のごとく、 K_m は MALD に対して DPNH を使用した場合には 1×10^{-4} M、TPNH の場合には 1.2×10^{-4} M である。すなわち酵素と基質との結合力、親和力が大なることを示す。また酵素は p-chlormercuribenzoate (PCMB) およびヨード酢酸を加えることにより表 2 に示すごとくその作用は阻害される。したがってこの酵素は SH 基を有する酵素である。

図 4. 活性度曲線

表 2. SH 基阻害物質

添 加	濃度 (M)	$\Delta E_{340m\mu/3分}$	阻害率 (%)
な し		0.016	0
PCMB	1×10^{-4}	0.00	100
"	1×10^{-5}	0.007	70
ヨード酢酸	1×10^{-4}	0.008	50
"	1×10^{-3}	0.00	100

e. ペーパークロマト法による MVA の確認

MALD がこの酵素により DPNH または TPNH によつて還元されて MVA になることは分光学的に立証されたが、さらに MALD に酵素を作用し生じた MVA を確認しようとした。すなわち 200 μ moles の磷酸緩衝液 (pH 6.2), 21.2 μ moles の MALD, 26 μ moles の DPNH, 20 μ moles の EDTA と 0.5mg の酵素を加え全量 3.2 ml とし 37°C 2 時間 incubate し、沸騰水で 1 分加熱し蛋白を沈殿させ、遠心分離しその上清をドライアイス-アセトン浴の低温下で濃縮乾燥し、これに 0.1 ml の水を加え溶解し、その一部を Whatman No. 1 の濾紙で、展開はエタノール-アンモニア-水 (85:5:15) で 6 時間行ない、風乾後ブローム、フェノール、ブルー液で発色した。MVA は Rf 0.62 で黄色の background に青くあらわれる。なおこの Rf の値は前もつて MVA-2-C¹⁴ で同様にしない、その放射能より確か

められたものである。この放射能は Automatic chromatogram Scanner (Vanguard Instrument 社製) を用いた。

結 論

1. ネズミ肝より mevaldic acid を mevalonic acid に還元する酵素を分離す。
 $\text{Mevaldic acid} + \text{DPNH (または TPNH)} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Mevalonic acid} + \text{DPN (または TPN)}$
2. 酵素は 250 倍に純化され、SH 基を有する酵素で最適 pH は 6.2, Km は $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ (DPNH), $1.2 \times 10^{-4} \text{M}$ (TPNH) である。

稿を終るにあたりアメリカ、カリフォルニア大学医学部生化学教室主任教授 Dr. David M. Greenberg のご助言ならびにご厚意に対し心より深謝する。

文 献

- 1) Hutchens, T. T., Van Bruggen, J. T., Cockburn, R. M. & West, E. S.: J. Biol. Chem., 208: 115, 1954.
- 2) Scaife, J. E. & Migicovsky, B. B.: Can. J. Biochem. & Physiol., 35: 615, 1957.
- 3) Bucher, N. L. R., McGarrah, K., Gould, E. & Loud, A. V.: J. Biol. Chem., 234: 262, 1959.
- 4) Fletcher, K. & Myant, N. B.: J. Physiol., 154: 145, 1960.
- 5) Gamble, W. & Wright, L.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 107:

- 160, 1961. 6) Gould, R. G. & Popjak, G.: *Biochem. J.*, **66**: 51, 1957. 7) Steinberg, D. & Avigan, J.: *J. Biol. Chem.*, **235**: 3127, 1960. 8) Greenberg, D. M., McGrath, H. & Nakamura, H.: *Acta isotopica*, **2**: 119, 1961. 9) Lynen, F.: *Biosynthesis of Terpenes and sterol*, Churchill Ltd, London, p.95, 1959. 10) Coon, M. J., Kupiecki, F. P., Dekker, E. E., Schlesinger, M. J. & Del Campillo, A.: *ibid*, p.62. 11) Shunk, C. H., Linn, B. O., Huff, J. W., Tilfillan, J. L., Skeggs, H. R. & Folkers, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 3294, 1957. 12) Warburg, O. & Christian, W.: *Biochem. Z.*, **310**: 384, 1941~1942. 13) Tarnall, A. T., Bardawill, C. J. & David, M. M.: *J. Biol. Chem.*, **177**: 751, 1949. 14) Green, A. A. & Hughes, W. L.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, N. Y., Vol. I, p.76, 1955. 15) Peterson, E. A. & Sober, H. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 751, 1956.

*

*

*