

## 見返りの丘に立って

新潟大学医学部第二生化学教室

小野輝夫

Personal Memoirs of Lipid Research

Teruo ONO

*Department of Biochemistry,**Niigata University School of Medicine*

My career as a lipid biochemist started in 1961 at Sapporo and continued from 1978 to 2000 at Niigata. On the occasion of my retirement, my past research was summarized with an personal introspective mind. Most of topics, myelin P2 protein superfamily and squalene epoxidase, were considered to be peripheral to mainstream cholesterol biochemistry hitherto, however, it is certain that they will become a mine of knowledge to facing the new horizons towards the 21st century.

Key words: myelin P2 protein superfamily, fatty acid-binding protein, ileal bile acid binding protein (I-BABP, I-15P), oxygenase, squalene epoxidase

ミエリン P<sub>2</sub>タンパクスーパーファミリー, 脂肪酸結合蛋白, 回腸胆汁酸結合蛋白, オキシゲナーゼ, スクアレン・エポキシダーゼ

## 脂質研究から

退官を機会に印象に残る2つの主な研究の歩みを振り返ってみたい。

1) 脂肪酸結合蛋白の研究<sup>1)</sup>

脂質は水に溶けないことから細胞内での移動や機能の面で何らかの輸送あるいは結合蛋白の助けを借りて働

くことは容易に予想される。新潟大学に赴任した1970年代の後半 Arias 等の色素結合蛋白や, リガンディン, Mary Dempsy らのステロールキャリアプロテインの論文が特にコレステロールの仕事をしていた私の気を惹き, 当時教室にいた小谷助手(現本学理学部教授)に相談したところ分子量2万以下の蛋白で一次構造が明らかにされていないのは信じられないし, 精製でき

Reprint requests to: Teruo ONO,  
195 Hanakawa kita-3-jo 5-chome  
Ishikari 061-3213

別刷請求先:  
〒061-3213 石狩市花川北3条5丁目195  
小野輝夫

れば遺伝子工学より早くアミノ酸側から構造が決められるかもしれないとの意見であった。当時脂質代謝に関する酵素蛋白の構造で解明されているものは殆どなく、研究室の高橋博士にそのテーマでの研究を頼んだところラット肝臓の上清から Mary Dempsy や Aries 等の報告したアミノ酸組成と全く同一の蛋白を精製し、N-端がブロックされていたり charge isoforms が存在するなど構造決定、純度など苦労しながら、アミノ酸側からの完全一次構造決定を成し遂げた。精製された蛋白からの内因性脂質検索では脂肪酸を検出したもののリガンドが多岐にわたる可能性を考慮し報告に際し脂肪酸結合蛋白の名前をためらって分子量の順にリガナン対してつけられていた X, Y, Z の Z に相当することから Z-プロテインとして報告した。これが脂肪酸結合蛋白の世界で最初の完全一次構造の報告となった<sup>2)</sup>。しかもホモロジー検索から我々の決定した構造が細胞内のレチノール結合蛋白やレチノイン酸結合蛋白の部分構造と相同性があること、多発性神経炎の基因物質と考えられ既に完全一次構造が報告されていた神経鞘にある Myelin P2 蛋白と相同性を示すことが判明し、高橋・小谷は改めてこれらの蛋白がプロテインスーパーファミリーを形成していることを報告<sup>3)</sup>、Myelin P2 蛋白は後に脂肪酸結合能を持つことが慶応大の植村らにより実証された。セントルイスの Jeffrey Gordon 等の分子生物学手法からの参入もありその後臓器組織により発現されている脂肪酸結合蛋白には一次構造を異にする幾つかの脂肪酸結合蛋白分子種が存在することが次々と知られるようになった。教室からの報告には肝型脂肪酸結合蛋白の Charge isoform については人見が<sup>4)</sup>、内科の木村は腎臓の脂肪酸結合蛋白を詳細に検討<sup>5)</sup>した他、当時腎型脂肪酸結合蛋白として報告されていた蛋白が既知の  $\alpha_2\text{U-globulin}$  であることを実証した<sup>6)</sup>。外科の神田は精力的に消化器系の脂肪酸結合蛋白分子種の報告<sup>7)8)</sup>を行ったが、その後の特筆すべき発展につながった I-15P の報告がある<sup>9)</sup>。この蛋白は胃液分泌を促進するとして既に報告された gastrotropin や乳腺から見出された Mammary derived growth inhibitor (MDGI) と構造上同一と考えられたが何れの機能も見いだせなかった。また脂肪酸結合能は実証出来ずリガンドは長いこと不明であった。藤井助教授により引き継がれたこの蛋白は実は胆汁酸結合蛋白 (Ileal Bile Acid Binding Protein, I-BABP) で胆汁酸の吸収運搬に役立ち、その遺伝子はプロモーター部位に胆汁酸をリガンドとし RXR と heterodimer を形成して転

写因子として機能する Nuclear orphan receptor の1つ FXR の結合部位 (FXRE) を持つことを明らかにし<sup>10)</sup>、脂肪酸結合蛋白を出発点にした研究はコレステロールの homeostasis への関与に収斂した。教室が発信した脂肪酸結合蛋白関連の論文は共同研究も含め40編を越える。

## 2) スクアレン・エポキシダーゼの研究<sup>11)</sup>

生化学の研究者として巣立つ出発点になったテーマにスクアレン・エポキシダーゼがある。母校の生化学教室に入って過ごしている内に、早石 修先生や佐藤 了先生が行った酸素添加酵素に関する先駆的仕事に興味を抱きコレステロールの合成系にも酸素添加反応があることからその酵素系を明らかにする仕事を選択した。当初はラット肝臓の1万g上清を粗酵素材に放射性メバロン酸からの NADPH 依存性不ケン化物への取り込みで生成物を分析検討したが、完全嫌気下ではスクアレンが蓄積したのに対しチトクローム P-450 分子種を阻害すると考えられていた一酸化炭素を気相に混ぜたり、チトクローム P-450 の阻害剤である SKF 薬剤を加えた系でもラノステロールが蓄積したことからメバロン酸からのラノステロール合成にはチトクローム P-450 分子種が関与しないと推定されラノステロール以降コレステロール合成にチトクローム P-450 分子種が関与する可能性が示唆され、意気揚々と日本の英文の生化学会誌に投稿したところ、NADPH 依存性にスクアレンのような疎水性の基質に酸素添加反応を行う酵素はミクロソームの電子伝達系と共役、末端酸化酵素はチトクローム P-450 以外に当時考えられなかったことまた女性ホルモン合成に与るアロマトラーゼはチトクローム P-450 分子種ではあるが一酸化炭素に対する感受性が極めて低いなどの理由で reject された。最初から挫折を味わったわけで、ハーバード大学のノーベル生理学賞受賞者 K. Bloch 教授が北海道を訪れた折り会う機会があり、データーを話をしたところ私のところでやってみないかと誘いを受けたが、留学が実現したのは学生紛争などもあり数年遅れてしまった。Bloch 教授は当時研究室で最も進展していた恥垢菌の脂肪酸合成酵素のテーマを選択するよう望んでおられた様だったが、紳士的にもう1つスクアレンエポキシダーゼも提示されその中から選ぶようにといわれ後者を選択したことを昨日の様に思い出す。何れにしてもラット肝臓のミクロソームを可溶化し2つの蛋白成分で酵素活性を初めて再構成することに成功し、1つは NADPH-cytochrome c

reductase 活性を持つこと、もう1つはエポキシダーゼの末端酸化酵素を含むと推定されこの分画を部分精製し比活性を上げてヘム含量と平行せずむしろヘムを殆ど検出できなくとも酵素活性を検出できることからチトクローム P-450 分子種の関与にやはり否定的な結果を得た。幸運なことに同じ時期に Sprinson らは酵母のポルフィリンミュータントでラノステロールが蓄積していることを明らかにし私共の仕事が間接的に支持された<sup>12)</sup>。その後 NADPH 依存のミクロソーム電子伝達系と共役する末端酸化酵素として知られるものでチトクローム P-450 分子種でないものにはスクアレノ・エポキシダーゼの他ヘムオキシゲナーゼがあるのみである。当初は酵素系の再構成の性質、クローニングのためのアミノ酸配列の情報を得るために末端酸化酵素の精製に全力を挙げたが成功せず、新潟で榊原助手の卓越したアイデアと手法で世界で初めて阻害剤を用いたセレクション法によりラットの酵素をクローニング報告した<sup>13)</sup>。酵素の発現の調節に関しては内科の中村が<sup>14)</sup> またヒト遺伝子の染色体局在を永井等が報告<sup>15)</sup>、ヒトゲノムの構造も明らかにされ目下プロモーター機能が解析されつつあるほか、Nuclear orphan receptor の1つ LXR  $\alpha$  を介した制御により調節されることが示唆された。コレステロール生合成の律速酵素として薬剤治療の標的とされる HMG-CoA reductase と同様にコレステロール生合成に与る酵素の中で律速酵素であることが DNA チップを用いた実験から最近確認され第二世代の薬剤開発の標的として注目されている。

## 文 献

- 1) 小野輝夫, 小谷昌司, 人見雅弘: 脂肪酸結合蛋白の構造と機能 蛋白質核酸酵素 35: 236~247, 1990.
- 2) Takahashi, K., Odani, S. and Ono, T.: Primary structure of rat Z-protein. A low-Mr cytosol protein that binds sterol, fatty acids and other small molecules. FEBS Lett., 140: 63~66, 1982.
- 3) Takahashi, K., Odani, S. and Ono, T.: A close structural relationship of rat Z-protein to cellular retinoid binding proteins and peripheral nerve myelin P 2 protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 106: 1099~1105, 1982.
- 4) Hitomi, M., Odani, S. and Ono, T.: Glutathione-protein mixed disulfide decreases the affinity of rat liver fatty acid-binding protein for unsaturated fatty acid. Eur. J. Biochem., 187: 713~719, 1990.
- 5) Kimura, H., Odani, S., Nishi, S., Sato, H., Arakawa, M. and Ono, T.: Primary structure and cellular distribution of two fatty acid binding proteins in adult rat kidneys. J. Biol. Chem., 266: 5963~5972, 1991.
- 6) Kimura, H., Odani, S., Suzuki, J., Arakawa, M. and Ono, T.: Kidney fatty acid binding protein: identification as  $\alpha_2$ U-globulin. FEBS Lett., 246: 101~104, 1989.
- 7) Kanda, T., Iseki, S., Hitomi, M., Kimura, H., Odani, S., Kondo, H., Matsubara, Y., Muto, T. and Ono, T.: Purification and characterization of fatty acid binding protein from gastric mucosa of rats. Possible identity with heart fatty acid binding protein and its parietal localization. Eur. J. Biochem., 185: 27~33, 1989.
- 8) Kanda, T., Ono, T., Matsubara, Y. and Muto, T.: Possible role of rat fatty acid binding proteins in intestine as carriers of phenol and phthalate derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 1053~1058, 1990.
- 9) Kanda, T., Odani, S., Tomoi, M., Matsubara, Y. and Ono, T.: Primary structure of 15-kDa protein from rat intestinal epithelium. Sequence similarity to fatty acid binding proteins. Eur. J. Biochem., 197: 759~768, 1991.
- 10) Grober, J., Zaghini, I., Fujii, H., Jones, S.A., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Ono, T. and Besnard, P.: Identification of a bile acid responsive element in the human ileal bile acid binding protein gene. J. Biol. Chem., 274: 29749~29754, 1999.
- 11) 榊原 順, 小野輝夫: スクアレノエポキシダーゼ—もう1つのコレステロール合成律速酵素—蛋白質核酸酵素 39: 1508~1517, 1994.
- 12) Ono, T. and Bloch, K.: Solubilization and partial characterization of rat liver squalene epoxidase. J. Biol. Chem., 250: 1571~1579, 1975.
- 13) Sakakibara, J., Watanabe, R., Kanai, Y. and Ono, T.: Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. J. Biol. Chem., 270: 17~20, 1995.
- 14) Nakamura, Y., Sakakibara, J., Izumi, T., Shibata, A. and Ono, T.: Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in

- HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **271**: 8053~8056, 1996.
- 15) Nagai, M., Sakakibara, J., Wakui, K., Fukushima, Y., Igarashi, S., Tsuji, S., Arakawa, M. and Ono, T.: Localization of the squalene epoxidase gene (SQLE) to human chromosome region 8q24. 1. *Genomics* **44**: 141~143, 1997.
-