

論 文 内 容 要 旨

報 告 番 号	甲 薬 第 2 1 1 号	氏 名	秦 拓 也
学位論文題目	酵母と動物細胞の発現系を用いた CPT1 アイソザイムの特性の理解 に向けて		
<p>長鎖脂肪酸のβ酸化はミトコンドリアで行われ、その基質であるアシル CoA のミトコンドリア内への流入はミトコンドリア外膜に存在する酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) によって制御されている。CPT1 には CPT1a、CPT1b、CPT1c の 3 種類のアイソザイムが存在し、個々のアイソザイムの特性について酵母や動物細胞の発現系を用いて解析されているが、未だ解答が得られていない問題も数多く存在する。これらの問題のうち、本研究では、①酵母に発現させた CPT1 と動物細胞に発現させた CPT1 は性質が異なっているのかという課題と、②CPT1c は本当に不活性な分子であるのかという 2 つの課題に焦点を当て解析した。</p> <p>まず、酵母発現系と COS7 細胞発現系で発現させたラットの CPT1b の性質が異なるかどうか検証するため、両発現系から調製したミトコンドリア画分の CPT1b の発現レベルと CPT1 活性を比較した。その結果、CPT1b の発現レベルは酵母より COS7 細胞の方が約 3.6 倍高かったのに対し、調製したミトコンドリア画分の CPT1 活性は COS7 細胞よりも酵母の方がやや高い活性を示した。これらの結果から、発現させた CPT1b の 1 分子当たりの酵素活性は酵母と COS7 細胞で異なっており、酵母に発現させた CPT1b は COS7 細胞に発現させた CPT1b よりも約 5 倍高い特異活性を示すことが判明した。</p> <p>次に、CPT1c が本当に不活性な分子であるのかどうかについて検証を行った。過去に行われた発現系を用いた解析において、CPT1c は CPT1a よりもその酵素活性が顕著に低いことが報告されているが、これらの報告では発現させたアイソザイム間の発現レベルが比較されていなかったため、CPT1c が不活性な分子であるのか、あるいは、CPT1c の発現レベルが顕著に低いことであるのか不明であった。そこでまず、CPT1a、CPT1b、CPT1c の発現レベルを定量的に比較するため、各アイソザイムの標準タンパク質を大腸菌発現系により調製した。続いて、いずれのアイソザイムも認識する特異抗体を調製し、この抗体の各アイソザイムに対する反応性を既知量の標準タンパク質を用いて評価し、個々のアイソザイムの発現レベルを定量的に測定する実験系を構築した。その後、各アイソザイムを発現させた COS7 細胞の細胞ライセートにおける発現レベルと CPT1 活性を測定し、各アイソザイムの特異活性を比較した。その結果、CPT1a や CPT1b と比較して CPT1c の特異活性は顕著に低いことが判明した。続いて、CPT1c が不活性である原因の解明を試みた。CPT1 の活性発現にはその C 末端領域が重要であり、かつ CPT1c の C 末端領域は CPT1a や CPT1b よりも長いことから、この領域が CPT1c を不活性にしている可能性についてキメラ体や C 末端欠損体を調製して検証したが、この領域は CPT1c の酵素活性に影響を及ぼさないことが判明した。</p> <p>本研究から、酵母と COS7 細胞に発現させた CPT1b は特異活性が異なること、3 種の CPT1 アイソザイムのうち、CPT1c は不活性な分子であることを明確に示すことができた。</p>			