

論文内容要旨

組換えヒト長鎖アシル CoA 合成酵素 ACSL4 タンパク質の性状解析

薬学研究科生体分析化学専攻 松林（新原） 智子

【目的】長鎖脂肪酸に CoA を付加しアシル CoA を合成する長鎖アシル CoA 合成酵素 (ACSL) は、生体膜の主要成分であるリン脂質のリモデリング反応において中心的な役割を果たす。哺乳類の ACSL には、組織分布や基質特異性が異なる 5 つのアイソザイム (ACSL1, 3, 4, 5, 6) が存在する。このうちの 1 つである ACSL4 は、アラキドン酸脂肪酸を良い基質とすることが報告されており、発現組織においてアラキドン酸代謝反応の制御をはじめ、様々な機能を発揮することが示唆されているが、その詳細な酵素学的性状は不明のままである。また、ヒトにおいては 2 種類の splicing variant (V1 と V2) が存在することが明らかとなっているが、これら 2 種類の variant の性状の違いも不明である。

そこで、本研究ではヒト ACSL4V1 および V2 組換えタンパク質を調製し、さらに LC-MS/MS 法を用いた高感度な ACSL 活性の測定法を構築することにより、ACSL4 の 2 種類の variant の酵素学的解析を行った。

【方法】ヒト ACSL4V1 および V2 の C 末端に His-tag を挿入した発現ベクターを作成し、バキュロウィルス発現系により組換えタンパク質を発現させた。発現細胞の 10000×g 上清をコバルトアフィニティーカラムにより部分精製し、QTRAP LC-MS/MS を用いた系により、アシル CoA 合成活性を測定した。

【結果と考察】バキュロウィルス発現系により発現させたヒト ACSL4V1 および V2 組換えタンパク質を部分精製し、各種脂肪酸と反応させたところ、V1、V2 タンパク質はいずれもアラキドン酸(20:4)やエイコサペンタエン酸(20:5 ; EPA)、ドコサヘキサエン酸(22:6 ;DHA)といった高度不飽和脂肪酸と反応し、LC-MS/MS を用いた系により、各々の脂肪酸由来のアシル CoA の生成が確認された。また、これまで報告されていないアドレン酸 (22:4) も特異

的に反応することがわかった。ただし、V1、V2 タンパク質の間に大きな基質特異性の違いはみられず、両者はいずれも高度不飽和脂肪酸を良い基質としたが、飽和脂肪酸であるミリスチン酸(14:0)、パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)や、不飽和脂肪酸だが炭素-炭素二重結合を1つしか含まないオレイン酸(18:1)とは、ほとんど反応しなかった。また、炭素-炭素二重結合を2つ含むリノール酸(18:2)に対する活性は、いずれの variant にも検出されたが、弱いものであった。

さらに、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸については、脂肪酸の基質濃度を変化させ、 K_m 値および V_{max} 値を求めた。V1、V2 タンパク質の3種類の脂肪酸に対する K_m 値はほぼ同程度であった。一方、用いる脂肪酸により V_{max} 値は大きく異なり、いずれの variant においても、 V_{max} 値はアラキドン酸 > エイコサペンタエン酸 > ドコサヘキサエン酸の順であった。

以上の結果より、ACSL4V1 および V2 は、ともに発現組織において様々な高度不飽和脂肪酸の代謝に深く関与することが示された。また、いずれの variant においても、高度不飽和脂肪酸の種類により親和性は変化しないものの V_{max} 値が異なり、中でもアラキドン酸に対し高い活性を示すことが明らかとなった。