

脂質代謝に関連した酵素ならびにホルモンに対する 遺伝子作用の発現機構

中西重忠

(京都大学医学部医化学)

Control Mechanisms of Gene Expression of an Enzyme and a Polypeptide Hormone Involved in the Lipid Metabolism in Higher Animals

Shigetada NAKANISHI

Department of Medical Chemistry, Kyoto University Faculty of Medicine.

Summary We have discussed the regulatory mechanisms of gene expression in higher animals, covering the following aspects on the basis of our recent results:

1. The regulation of lactose operon in *Escherichia coli* has been discussed as a model system for studies on the regulation of gene expression in animal systems.

2. Acetyl-CoA carboxylase plays a critical role in the regulation of biosynthesis of long-chain fatty acids. In an attempt to gain insight into the molecular mechanisms underlying the regulation of synthesis of hepatic acetyl-CoA carboxylase, we have been able to identify specific polysomes involved in the synthesis of this enzyme. Furthermore, it has been demonstrated that the relative content of these polysomes in the liver correlates well with the rate of hepatic synthesis of the enzyme under different dietary and hormonal conditions.

3. The pituitary hormone, corticotropin (ACTH), which is a single polypeptide consisting of 39 amino acids, has some interesting features with respect to the regulation of its biosynthesis. First of all, we have attempted to synthesize ACTH in a cell-free heterologous system. Our studies indicate that ACTH mRNA is translated in wheat germ extracts into a product which contains the amino acid sequence of ACTH but is much larger (M.W. approximately 35,000) than this hormone (M.W. approximately 4,500).

高等動物の遺伝子発現は転写、翻訳の段階で非常に正確に調節されており、この正確な調節に異常がおこると、細胞の癌化、分化異常、あるいはある種の発生の異常や代謝調節の異常が生じることは容易に想像されることである。したがってこれら種々の現在医学が直面している諸問題を解決するためには、高等動物遺伝子発現の詳細な調節機構を理解す

る必要がある。しかし現時点においては高等動物の遺伝子発現の詳細な調節機構はその複雑さのためにほとんど明らかになっていない。したがって本シンポジウムにおいては、私自身過去にたずさわりの、また現在もっとも明らかになっている大腸菌の lactose operon の例をとり、遺伝子発現の基本的な調節機構を紹介し、次にわれわれが現在とりこんでいる問題、すなわち第 1 に脂肪酸合成の調節に重要な役割を果たしている acetyl-CoA carboxylase の誘導、抑制機構について、第 2 に副腎のステロイド産生の調節を司るホルモン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の試験管内での生合成について報告し、高等動物における遺伝子発現の調節機構に関する研究の一面を紹介したい。

1. 大腸菌 lactose operon の調節機構

大腸菌の lactose operon の調節機構に関しては遺伝解析から Jacob と Monod¹⁾ によって有名な operon theory が提唱され、その後、Gilbert²⁾、また私が研究に従事した Pastan ら^{3,4)} の研究室において分子生物学的手法により次に述べるごとくその詳細な機構が現在明らかにされている (図 1 参照)。

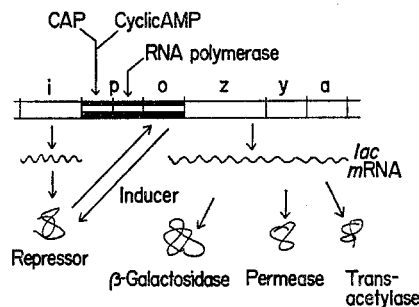


図 1. 大腸菌 lactose operon の調節機構
 P: プロモーター O: オペレーター
 i, z, y, a: それぞれ repressor, β -galactosidase, permease, galactoside-transacetylase の構造遺伝子

1) lactose の代謝に関与する β -galactosidase, permease, galactoside-transacetylase の 3 つのタンパクは全く同じ誘導、抑制の調節を受けている。このように 3 つのタンパクが coordinate regulation を受けるのは、3 つのタンパクの構造遺伝子が一つの cluster をつくり、この 1 単位が 1 個の messenger RNA として DNA より転写され、この messenger RNA を鋳型としてそれぞれのタンパクがつくられるからである。

2) 上記 3 つのタンパクの誘導、抑制は転写の段階、すなわち lactose messenger RNA 合成の段階で調節されている。

3) 第 3 に lactose messenger RNA 合成の調節は正負の両因子が関与している。正の因子としては cyclic AMP と cyclic AMP が結合する CAP と呼ばれるタンパクが関与し、この両者の働きにより RNA polymerase が promoter 部位に結合し、その結果 lactose messenger RNA の合成が開始する。大腸菌の菌体内 cyclic AMP の濃度は培地の条件、

ことに炭素源によって変化し、例えば大腸菌をブドウ糖で培養すると菌体内 cyclic AMP の濃度は著明に減少し、その結果 lactose operon の発現は見られない。一方、負の因子としては調節遺伝子でつくられる lactose repressor が関与し、この repressor が operator 部位に結合することにより lactose messenger RNA 合成の開始が阻害される。lactose repressor は inducer, 例えば lactose の代謝産物と結合するとタンパク構造が変化し、その結果 repressor は operator から離れ lactose messenger RNA の合成が開始する。このように lactose operon の発現は正負の因子によって微妙に調節され、lactose operon にコードされている3つのタンパクは環境の変化に応じ非常に合目的に誘導、抑制されている。

以上、大腸菌の lactose operon の例をとり遺伝子発現の基本的な機構を紹介したが、大腸菌の他の operon, 例えば galactose operon⁸⁻⁹⁾ の調節も基本的には lactose operon と同様、主として転写の段階で正あるいは負の因子によって微妙に調節されていることが明らかとなっている。

2. 肝臓 acetyl-CoA carboxylase の誘導、抑制機構

高等動物の遺伝子発現の調節機構は、最近、分化した細胞に多量に合成されているタンパク、例えば hemoglobin, immunoglobulin 等の messenger RNA が精製され、次第に解析されつつあるが、その詳細な機構は全く不明である。

一方、代謝調節の律速段階を触媒するいわゆる律速酵素の誘導、抑制の機構に関する研究は、代謝調節の機構を知る上で非常に重要であるが、律速酵素であるがゆえに量的に少なく、未だ解析を試みられた例すら非常に少ない。そこで、脂肪酸合成の調節に律速酵素として重要な役割を果している acetyl-CoA carboxylase の誘導、抑制の機構に関する私どもの最近の知見を次に紹介したい。

肝臓の長鎖脂肪酸合成は種々の代謝条件によって著明に変動するが、この変動と一致して肝臓抽出液中の acetyl-CoA carboxylase の活性レベルが変動し、本酵素は長鎖脂肪酸合成の初段階酵素として脂肪酸合成の調節に重要な役割を果している⁹⁾。表1は、私どもがこれまで種々の代謝条件における肝臓抽出液中の acetyl-CoA carboxylase の活性レベルの変動の機構を免疫化学的に解析した結果をまとめたものである¹⁰⁻¹¹⁾。動物を絶食状態に置いた場合、動物を絶食後無脂肪高炭水化物食を与えた場合、アロキサン投与により動物が糖尿病になった場合、さらに遺伝性肥満症の場合、いずれも肝臓の脂肪酸合成が著しく増減するが、この増減と一致して肝臓抽出液中の acetyl-CoA carboxylase の活性レベルが変動し、この活性レベルの変動は本酵素の量の変動によることを表1の結果は示している。

さらに種々の条件における acetyl-CoA carboxylase の合成速度および分解速度を検討した結果、表1に同時に示したごとく、絶食ラットに見られる酵素量の減少は合成、分解の両者によって調節されているが、他の条件の酵素量の変動は主として酵素の合成速度の変化によることが明らかである。そこでこのように酵素量の変動に主として関与する酵素の合成の調節機構をさらに解析するために、acetyl CoA carboxylase を合成しているポリゾームの同定、定量を試みた¹²⁻¹³⁾。

表 1. 種々の代謝条件における肝臓 acetyl-CoA carboxylase の酵素量, 酵素の合成および分解速度の変化¹⁰⁻¹¹⁾

Animals	Enzyme content (E)	Rate of synthesis (k_s)	Rate of degradation (k_d)	k_s/k_d
Rats	%	%	%	
Normal	100	100	100	100
Fasted	28	54	190	28
Refed	376	405	107	378
Diabetic	53	59	100	59
Mice				
Normal	100	100	100	100
Obese	1,020	775	58	1340

In steady state: $E = k_s/k_d$

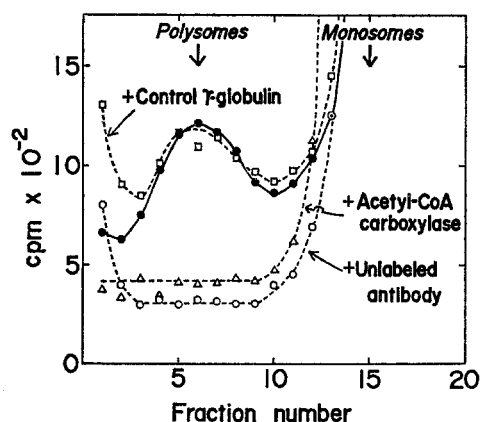


図 2. ¹²⁵I-標識抗体による acetyl-CoA carboxylase 合成ポリゾームの同定¹²⁾

ポリゾームの同定, 定量には, acetyl-CoA carboxylase に対する特異的抗体を ¹²⁵I で標識し, この ¹²⁵I-標識抗体がポリゾーム上の acetyl-CoA carboxylase の nascent peptide に結合する量を測定する方法を用いた. その結果, 図 2 に見られるごとく本方法により非常に特異的に acetyl-CoA carboxylase 合成ポリゾームが同定できることが明らかとなった. すなわち ¹²⁵I-抗体とポリゾームを反応させ, 反応液を蔗糖密度勾配法で遠心すると ¹²⁵I-抗体は重いポリゾームに結合している. あらかじめ過剰の標識していない acetyl-CoA carboxylase 抗体をポリゾームに加えると, この過剰の抗体により ¹²⁵I-抗体のポリゾームへの結合は拮抗される. 一方, 対照 γ -グロブリンで同じ処理をしても対照 γ -グロブリンは ¹²⁵I-抗体のポリゾームへの結合に全く影響を与えない. さらに精製した acetyl-CoA carboxylase をポリゾームに加えると, この精製酵素がポリゾーム上の

表 2. 種々の代謝条件における肝臓 acetyl-CoA carboxylase の合成速度の変化と本酵素を合成しているポリゾーム量の変動の比較¹²⁻¹³⁾

Animal	Rate of synthesis	Content of polysome
	(gram liver)	
Rats		
Normal	1.0	1
Fasted	0.5	1/2
Refed	4.1	4
Diabetic	0.6	1/2
Mice		
Normal	1.0	1
Obese	2.7	2

nascent な acetyl-CoA carboxylase の peptide と拮抗し、¹²⁵I-抗体のポリゾームへの結合は著しく阻害された。以上の実験結果より ¹²⁵I-抗体は acetyl-CoA carboxylase を合成しているポリゾームに特異的に結合し、またこの結合は加えたポリゾームに対し定量的に反応することが明らかとなったので、次に前述した種々の条件における肝臓の acetyl-CoA carboxylase 合成ポリゾーム量を比較検討した。

表 2 はその結果をまとめたもので、種々の代謝条件における肝臓グラム当りの acetyl-CoA carboxylase 合成ポリゾーム量とそれぞれの条件における本酵素の合成速度の変化が示してある。この表から明らかのように、肝臓の acetyl-CoA carboxylase の合成速度の増減は本酵素を合成しているポリゾームの量とよく一致して変動していることが明らかである。このことは、肝臓の acetyl-CoA carboxylase の合成速度の変化が大腸菌に見られる酵素の誘導、抑制の機構と同じく本酵素の messenger RNA 量の変化に起因していることを強く示唆している。

次にこのように転写の段階で調節されていると考えられる acetyl-CoA carboxylase の誘導、抑制を制御する調節因子に関して、最近上領ら¹⁴⁾は酵母を用いた示唆に富む結果を報告しているのでそれを紹介したい。酵母は動物細胞と同じく有核細胞で、かつ大腸菌と同様遺伝的解析が比較的容易であり、高等生物のモデル系として好個のものである。さて上領らの結果によると、酵母の培地に脂肪酸を加えると酵母の acetyl-CoA carboxylase の合成が著しく阻害されるが、一方脂肪酸から脂肪酸 CoA をつくる酵素、acyl-CoA synthetase の欠損した変異株に脂肪酸を加えても acetyl-CoA carboxylase の合成の低下は全く見られない。この事実から上領らは図 3 に示したごとく acetyl-CoA carboxylase の合成の抑制には脂肪酸 CoA あるいはこの代謝産物がなんらかの形で関与していることを示唆し、現在何が直接調節因子として働くか精力的に解析を試みている。前述したように、肥満症、糖尿病の最も顕著な代謝異常の 1 つは脂肪酸合成の調節異常であるから、調節因子が明らかになれば肥満症、糖尿病の治療および原因の解明に新しい方向性が開かれると考えられる。

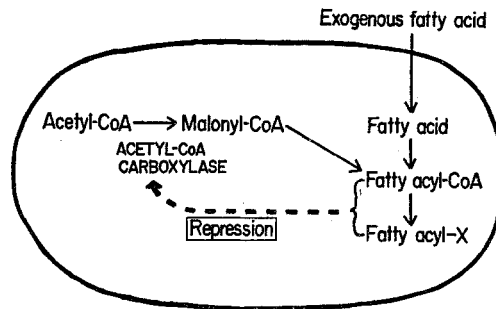


図 3. Acetyl-CoA carboxylase の抑制機構¹⁴⁾

3. 副腎皮質刺激ホルモンの *in vitro* 合成

副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は下垂体から分泌され副腎のステロイド産生の調節を司る重要なホルモンであり、本ホルモンの分泌異常によって Cushing 病などが起こり、本ホルモン産生の調節機構を明らかにすることは医学的にも重要な問題である。さらに本ホルモンの産生は、視床下部でつくられる corticotropin releasing factor および副腎のステロイドホルモンによって正負に調節され、ACTH 産生調節の分子機構を解析することは高等動物の遺伝子発現の調節機構を知る上でも非常に興味あるところである。

ACTH は39個のアミノ酸からなる分子量約 4,500 の single polypeptide hormone であるが、最近平田ら¹⁵⁾により下垂体においては分子量 約30,000 前後の前駆体の形で合成されることが示唆された。しかし、この前駆体は生体内、および分離、精製の過程で分解酵素によって容易に分解され、未だ分離、精製されておらず、ACTH 前駆体合成調節の分子機構はもちろん、ACTH 前駆体の諸性質もほとんど明らかでない。

そこでわれわれは、神戸大学の井村研究室と協同研究により ACTH 産生調節の分子機構を明らかにし、また ACTH messenger RNA から直接読みとられた ACTH 前駆体を得るために、下垂体 messenger RNA から wheat germ の無細胞タンパク合成系によって ACTH 前駆体を試験管内で合成することを試みた¹⁶⁾。具体的には放射能で標識したアミノ酸およびタンパク合成に必要な基質を加えた wheat germ の無細胞タンパク合成系に分離した下垂体の messenger RNA を加えタンパクを合成する。次に、合成された標識タンパクから ACTH 抗体およびその抗体に対する抗体を加えるいわゆる double antibody immunoprecipitation 法で immunoprecipitate をつくらせ、合成された ACTH の前駆体を回収する。ACTH 前駆体の分子量は sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis によって決定した。

図 4 は、ACTH の 19番から 24番目のアミノ酸配列に対する抗体を用いた際の実験結果を示したものであるが、明らかに ACTH 抗体によって分子量約35,000と分子量約22,000 のタンパクが回収されている。前者の放射能のピークは ACTH 抗体を加えるかわりに対照 γ -グロブリンを加えた場合には現れないことから、ACTH 抗体によって特異的に反応した生成物は分子量約35,000のタンパクであることが強く示唆される。さらに前者のタン

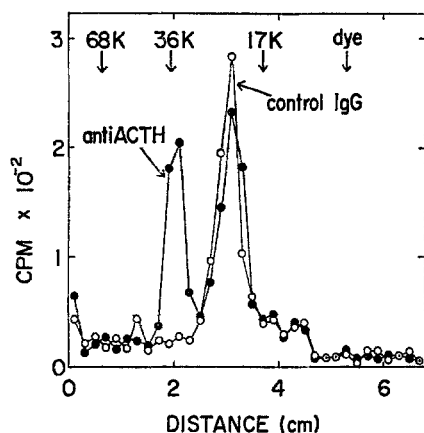


図4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis による前駆体の分子量の決定

無細胞タンパク合成系によって合成された ACTH 前駆体を抗体により回収し, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis を行った¹⁶⁾.

バクの抗体への結合は (1~18) ACTH の添加によっては全く拮抗されないが (1~24) ACTH の添加により完全に拮抗されることから分子量約 35,000 のタンパクは19番から24番目の ACTH のアミノ酸配列に対する抗体によって特異的に反応したものであること, すなわち ACTH 前駆体は分子量約 35,000 のタンパクであることが明らかである. 後者の peak は, 抗原抗体反応の際に非特異的にまきこまれたタンパクである. さらに peptide mapping によるタンパク化学的方法によっても分子量約 35,000 のタンパクが ACTH のアミノ酸配列を持つことが確かめられた.

以上の実験結果より, 試験管の中で下垂体 messenger RNA から ACTH 前駆体が合成されることが明らかとなった. このことは今後この系によって下垂体 ACTH messenger RNA 量が測定できることを意味するので, 今後この系によって ACTH 産生調節の分子機構を追求したい. 一方, われわれの結果より分子量約 4,500 の ACTH は分子量約 35,000 の非常に大きな前駆体からできてくることが明らかとなり, この事実は ACTH 前駆体の中で ACTH 以外の部分がいかなる生物学的意味を持つのかという興味ある問題を提起している.

以上, 本シンポジウムにおいて最近のわれわれの仕事を中心に, 大腸菌の遺伝子発現の基本的機構を参考にしながら, 高等動物遺伝子発現の調節機構の一面を紹介した. 今後現在の仕事を発展させることにより, 高等動物遺伝子発現の詳細な分子機構を少しでも明らかにしたいものと考えている.

REFERENCES

- 1) Jacob, F. and Monod, J. 1961. *J. Mol. Biol.* 3: 318.
- 2) Gilbert, W., Maizels, N. and Maxam, A. 1974. Cold Spring Harbor Symposium 38: 845.
- 3) De Crombrughe, B., Chen, B., Anderson, W., Nissley, P., Gottesman, M., Perlman, R. and Pastan, I. 1971. *Nature New Biol.* 231: 139.
- 4) Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M. and Pastan, I. 1975. *J. Biol. Chem.* 250: 8262.
- 5) Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M. and Pastan, I. 1973. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 334.
- 6) Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M. and Pastan, I. 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 5937.
- 7) Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M. and Pastan, I. 1974. *J. Biol. Chem.* 249: 4050.
- 8) Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M. and Pastan, I. 1974. *Cell* 3: 39.
- 9) Numa, S., and Yamashita, S. 1974. *Curr. Top. Cell. Regul.* 8: 197.
- 10) Nakanishi, S. and Numa, S. 1970. *Eur. J. Biochem.* 16: 161.
- 11) Nakanishi, S. and Numa, S. 1971. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68: 2288.
- 12) Nakanishi, S., Tanabe, T., Horikawa, S. and Numa, S. 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 2304.
- 13) Tanabe, T., Horikawa, S., Nakanishi, S. and Numa, S. 1976. *FEBS Lett.* 66; 70.
- 14) Kamiryo, T., Parthasarathy, S. and Numa, S. 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 386.
- 15) Hirata, Y., Yamamoto, H., Matsukura, S. and Imura, H. 1975. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 106.
- 16) Nakanishi, S., Taii, S., Hirata, Y., Matsukura, S. Imura, H. and Numa, S. 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 4319

[追記] 最近われわれは ACTH messenger RNA より合成された ACTH 前駆体に、生物学的に重要な下垂体ホルモン、エンドルフィンおよび色素細胞刺激ホルモンなどが同時に含まれていること¹⁷⁾、およびステロイドホルモンは ACTH 産生を ACTH messenger RNA 量を変動させることによって調節していること¹⁸⁾を明らかにした。

- 17) Nakanishi, S., Inoue, A., Taii, S. and Numa, S. 1977. *FEBS Lett.* in press.
- 18) Nakanishi, S., Kita, T., Taii, S., Imura, H. and Numa, S. 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74: 3283.