



# 酸化酵素に関する研究ーブタ白血球由来アラキドン酸5-リポキシゲナーゼおよびカビ由来菌体外ラッカーゼー

金子, 修至

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4548

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004548>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 金子 修至  
博士の専攻分野の名称 博士（学術）  
学 位 記 番 号 博い第 4548 号  
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

酸化酵素に関する研究—ブタ白血球由来アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼおよびカビ由来菌体外ラッ  
カーゼ—

審 査 委 員

主 査 教 授 青木 健次  
教 授 山形 裕士  
教 授 北川 浩

氏名	金子 修至		
論文 題目	酸化酵素に関する研究—ブタ白血球由来アラキドン酸5-リポキシゲナーゼおよびカビ由来菌体外ラッカーゼ—		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	青 木 健 次
	副 査	教 授	山 形 裕 士
	副 査	教 授	北 川 浩
	副 査		
	副 査		
要 旨			
<p>生物が生命活動を維持するために、酸化酵素（酸化還元酵素）の存在は不可欠である。これまでに、多数の酸化酵素が発見され、それらの性質や生体内における生理的な役割などが報告されてきた。本研究では、動物由来酸化酵素であるブタ白血球アラキドン酸5-リポキシゲナーゼおよび微生物由来ラッカーゼを得て、それらの特性を明らかにするとともに、応用を図ることを目的とした。</p> <p>本論文は序論、1章から8章、総括により構成される。</p> <p>序論では、プロスタグランジンおよびロイコトリエンの生合成経路を述べ、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼの関与する酵素反応および従来の研究経過について詳説している。また、微生物由来酸化酵素を得てそれを利用することの意義を述べている。</p> <p>第1章では、ブタ白血球可溶性画分中にアラキドン酸5-リポキシゲナーゼ活性を見だし、本酵素反応の生産物の同定を述べている。[1-<sup>14</sup>C] アラキドン酸を基質として酵素反応を行ったが、共存するアラキドン酸12-リポキシゲナーゼによる酵素反応生産物が大量に生成したため、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼによる生産物は検出が困難であった。そこで、アラキドン酸12-リポキシゲナーゼのモノクローナル抗体を用いて本酵素を除去したのち、酵素反応を行い、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼによる生産物を5-ヒドロキシ-6,8,11,14-エイコサテトラエン酸と同定した。</p> <p>第2章では、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼの精製を述べている。本酵素は極めて不安定であったので、安定化条件を検討し、Tween 40 およびジチオスレイトールの存在が本酵素を安定化させることを見いだした。この条件下で、DE52 cellulose カラムクロマトグラフィーを行った結果、共存するアラキドン酸12-リポキシゲナーゼを分離させ、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼを35倍に部分精製することができた。この精製酵素は、従来報告された精製酵素に比べて6.4倍の高純度であった。</p> <p>第3章では、本酵素を用いたモノクローナル抗体の作製について述べている。第2章で得た精製酵素を用いた結果、従来成功しなかったアラキドン酸5-リポキシゲナーゼに対する数種類のモノクローナル抗体を作製することができた。</p> <p>第4章では、作製したモノクローナル抗体を用いたアラキドン酸5-リポキシゲナーゼの定量法を述べている。すなわち、二抗体サンドイッチ法による本酵素の定量法を確立した。本法を用いると、既報の定量法である[1-<sup>14</sup>C] アラキドン酸を用いる方法に比べて20倍の高感度が得られることがわかった。</p>			

氏名	金子 修至
<p>第5章では、ブタの各臓器中のアラキドン酸5-リポキシゲナーゼの分布について述べている。4章で確立した定量法を用いて本酵素を測定した結果、本酵素は白血球に多量含まれており、続いて肺、膵臓、回腸、胸腺、リンパ節の順に多く分布することがわかった。この結果は放射能を用いる方法と高い相関性を示した。本酵素が、従来知られていなかった肺、膵臓などにも含まれることが明らかとなり、本定量法は、本酵素の生理的意義を解明する上で極めて有力な武器になりうると考察した。</p> <p>第6章では、ブタ由来アラキドン酸5-リポキシゲナーゼを抗原として作製したモノクローナル抗体と他の動物組織由来アラキドン酸5-リポキシゲナーゼとの交叉性について述べている。作製したモノクローナル抗体のうち、5<i>Lox-3</i>は、ヒト、モルモット、ウシの白血球由来アラキドン酸5-リポキシゲナーゼと交叉性を示すことを明らかにした。</p> <p>第7章では、糸状菌由来メラニンを分解する微生物の分離と同定について述べている。浴室から分離した糸状菌B-1株のメラニンを分解するBP-11-2株を分離し、顕微鏡による形態観察および28S rRNA 遺伝子などの解析により、BP-11-2株を <i>Phlebia radiata</i>、B-1株を <i>Cladosporium</i> 属と同定した。BP-11-2株の培養液中に2,6-ジメトキシフェノールを酸化する酵素を見いだした。本酵素は、B-1株から調製したメラニンや2,5-xylylidine などにより誘導生産された。</p> <p>第8章では、本酵素の精製と主な性質を述べている。BP-11-2株の培養液から、硫酸分画、DE52 cellulose、DEAE-Toyopearl 650Sを用いたカラムクロマトグラフィーにより250倍に精製し、最終的に比活性2.5 units/mgの単一標品を得ることができた。本酵素は分子質量61 kDaのモノマーであり、ラッカーゼの1種であった。しかし、本酵素は基質特異性、動力学的パラメーター、N末端アミノ酸配列などにおいて、既報のラッカーゼとは異なっており、新しいタイプのラッカーゼであると考察した。</p> <p>総括では、本研究で得た酸化酵素の応用性について総合的に考察している。すなわち、アラキドン酸5-リポキシゲナーゼの活性を中和する抗体を新しいタイプの抗喘息薬開発に、また、ラッカーゼを防かび剤開発にそれぞれ応用することなど、今後の展望を述べている。また、研究材料としての動物および微生物由来酸化酵素の特徴を対比させ、考察を加えている。</p> <p>本研究は、従来報告の少ないアラキドン酸5-リポキシゲナーゼおよび特異なラッカーゼを研究したものであり、新規な酵素化学的、生理学的な性質を見いだすなど、酸化酵素について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。</p> <p>よって、学位申請者の金子 修至は、博士（学術）の学位を得る資格があると認める。</p>	

## 論文内容の要旨

氏 名 金子 修至

専 攻 生 命 科 学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

酸化酵素に関する研究—ブタ白血球由来アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼ

およびカビ由来菌体外ラッカーゼ—

指導教員 青木 健次

## 要 旨

酸化酵素の研究としてブタ白血球由来アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼおよびカビ由来菌体外ラッカーゼに関して研究を行った。

まず、ブタ白血球由来アラキドン酸 5-リポキシゲナーゼに関しては、12-リポキシゲナーゼの存在しか知られていなかったブタ白血球可溶性画分中に 5-リポキシゲナーゼ活性を見出し、この酵素を DE52 cellulose カラムクロマトグラフィーを用いることによって、従来報よりも約 6.4 倍比活性が高い 5-リポキシゲナーゼの部分精製品を得た。

この 5-リポキシゲナーゼの部分精製品を抗原として C3H マウスに感作し、世界で最初に 5-リポキシゲナーゼに対する数種類のモノクローナル抗体の作製に成功した。

このうち抗原決定部位の異なる 2 種類の抗体 (一方の抗体を Fab に分解し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する) を用いて 5-リポキシゲナーゼをサンドイッチのように挟み込み、5-リポキシゲナーゼを高感度に定量できる方法、即ち、酵素免疫測定法 (2 抗体サンドイッチ法) を確立した。この方法は 5-リポキシゲナーゼ分子そのものを測定する方法であって、放射能 ( $[1-^{14}C]$  アラキドン酸) を基質として用いる 5-リポキシゲナーゼ活性測定法よりも約 20 倍高感度である。また、放射能を用いないので、放射性同位元素実験施設を必要とせず、放射性廃棄物の問題もなく、操作も簡便な方法である。また、 $[1-^{14}C]$  アラキドン酸を用いる 5-リポキシゲナーゼ活性測定法では、他のアラキドン酸を基質とする酵素や内因性の阻害物質が混在していると、本来そこにある 5-リポキシゲナーゼを検出し得ない可能性があるが、酵素免疫測定法では、免疫反応で 5-リポキシゲナーゼのみを特異的に沈降させて測定するので、この問題も回避される。

本法を用いてブタの様々な組織の 5-リポキシゲナーゼの含量を測定した結果、圧倒的に白血球に多く、次いで肺、脾臓、回腸、胸腺、リンパ節、空腸、脾臓、胃、甲状腺に多く分布していることが明らかとなった。このように 5-リポキシゲナーゼが白血球以外の様々な組織に分布し、定量した報告も世界最初である。

5-リポキシゲナーゼはアラキドン酸に酸素分子を添加してロイコトリエン合成の初発反応を触媒する酵素である。ロイコトリエン類は気管支収縮、血管透過性亢進、白血球活性化などの強力な生理活性を有し、アナフィラキシー反応や炎症における化学伝達物質としての役割が注目されている物質である。今回、白血球以外の様々な組織で 5-リポキシゲナーゼの存在が認められたことは、これらの組織においてロイコトリエンがなんらかの働きを担っていることが示唆された。

今回ブタはもちろんのことヒト、ウシ、モルモットの 5-リポキシゲナーゼとも交叉するモノクローナル抗体も得ることが出来た。さらに他の動物に対するこの抗体の交叉性を検討してゆけば、5-リポキシゲナーゼ分子の進化的知見が得られるものと考えられ

る。また、この抗体を用いて種々の動物の5-リポキシゲナーゼを精製し、そのモノクローナル抗体を作製して、各動物の5-リポキシゲナーゼの高感度定量法を確立すれば、その動物における5-リポキシゲナーゼの動態並びに5-リポキシゲナーゼに起因して産生されるロイコトリエンの生理的役割をさらに明らかにすることが可能である。さらに精製された5-リポキシゲナーゼ分子のN末端アミノ酸情報を得て、5-リポキシゲナーゼの遺伝子をクローニングすることにより、遺伝子レベルでの各動物間での比較検討も可能となる。また、精製した5-リポキシゲナーゼを用いて、再度マウスに感作し、5-リポキシゲナーゼ活性を中和するモノクローナル抗体が得られれば、喘息にかかわる主要なケミカルメディエーターであるロイコトリエンの生合成が阻害され、新しいタイプの抗喘息薬開発への応用も可能である。

次にカビ由来菌体外ラッカーゼに関して述べる。

兵庫、滋賀の山林から157種の土壌試料、52種の腐食木片試料を採取し、浴室から単離したメラニン生産糸状菌B-1株の色素を分解してハローを形成する菌株BP-11-2を単離した。28S rRNA遺伝子解析により、BP-11-2株は担子菌 *Phlebia Radiata*、B-1株は26S rRNA遺伝子解析により子嚢菌 *Cladosporium* 種と同定した。

BP-11-2株はB-1株以外にも、*A.alternata* NBC 31805 および台所より分離したC-23株に対してもハローを形成したが、他の菌株や、L-チロシン由来の合成メラニンに対しては脱色効果を示さなかった。これらの結果から、それぞれの糸状菌が産生するメラニンや合成メラニンは種類が異なっており、BP-11-2株は限られた種類のメラニンに対して分解活性を示す酵素を有すると考えられた。次に、このBP-11-2株をB-1株由来のメラニンを加えたPS培地で培養すると培養上清中に2,6-ジメトキシフェノールを酸化する酵素が誘導されることを見出した。この酵素は2-エトキシフェノール、2,5-キシリジン、4-メトキシフェノール、*p*-クレゾールによっても誘導されたが、合成メラニンでは僅かしか誘導されなかった。そこで誘導活性が最も強力であった2,5-キシリジンを用いて本酵素をBP-11-2株から大量に生産し、DE52 cellulose および DEAE-Toyopearl 650Sを用いたカラムクロマトグラフィーによって250倍精製し、単一な精製酵素標品を得た(分子量61kdのモノマー、比活性2.5 units/mg)。

本酵素は、pH 5.0において最大活性を示し、活性至適温度は70℃、pH 4.5~7.0で安定であり、pH 4.5で70℃、10分間処理しても、70%の活性が残存しており、85℃では完全に失活した。また、本酵素活性はMn<sup>2+</sup> およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって影響されず、Fe<sup>2+</sup> およびFe<sup>3+</sup>で完全に阻害され、Hg<sup>2+</sup>では強く阻害された。他の金属イオン、SH基修飾薬、キレート試薬ではほとんど影響されなかった。

これらの結果から、本酵素はラッカーゼの一種と考えられ、基質特異性を検討したと

ころ、本酵素は2,6-ジメトキシフェノール、グアヤコール、シリングアルダジン、ABTS、ヒドロキノン、4-メトキシフェノール、4-アミノフェノールに対して酸化活性を示し、そのKm値は2,6-ジメトキシフェノールに対して0.08 mM、ABTSに対しては0.049 mMであった。この親和性は既報のラッカーゼよりも高く、逆にグアヤコール、シリングアルダジン、ヒドロキノンに対する親和性は低値であった。また、本酵素はレゾルシノール、カテコール、ピロガロール、バニリン酸、ヒドロキノン、L-DOPA、L-チロシンに対しては酸化活性を示さず、色素化合物であるコンゴレッド、ブリリアントグリーン、ローダミン6G、ニグロシン、メチルオレンジに対しても脱色活性を示さなかった。

本酵素は糸状菌B-1株由来メラニンに対して高濃度(11 µg/ml)で分解活性を示したが、合成メラニンに対しては不活性であった。吸収スペクトル解析において一般にラッカーゼはその分子内に銅イオンを含んでおり、300-370 nmまたは600 nm付近、あるいはその両波長で吸収が認められるが、本酵素はこれらの報告とほぼ同一蛋白濃度において、蛋白に由来する280 nmのピーク以外の吸収が認められないことから、2,6-ジメトキシフェノールを酸化する新しいタイプのラッカーゼの可能性が考えられた。本酵素のN末端アミノ酸配列の検討(GIGPVTDFFI)においても高ホモロジーを有する既報のラッカーゼは認められず、本酵素は新しいタイプのラッカーゼであることが明確となった。

結論として、土壌由来の担子菌BP-11-2株が浴室由来の子嚢菌B-1株から産生されるメラニンを脱色し、そのメラニンによって、そのメラニン分解能を有する新しいタイプの菌体外ラッカーゼが誘導されてくることを見出した。細胞系に比べ、酵素系でのメラニン分解活性が低かったことから、この酵素がメラニン分解能を高度に発揮するには何らかのコンポーネントが関与しているものと考えられた。本酵素が合成メラニンに対しては分解活性を示さなかった理由として、カビメラニンと合成メラニンとの構造上の差異が原因であると考えられる。

今後、本酵素のcDNAクローニングを進め、既報告のラッカーゼとの相違点をさらに明白にし、高濃度ではあるが、本酵素がカビ由来のメラニン分解能を有することから、本酵素の産生誘導メカニズム、メラニン分解活性を高める条件、補酵素等の因子、分解メカニズムを解明することによって、本酵素の浴室、ビルの地下等における環境汚染に対する安全な防止剤、浄化剤としての応用が期待される。

リポキシゲナーゼは動物だけでなく、植物にも存在し、さらに微生物においても存在することが報告されている。シイタケ菌糸体を大豆油・大豆粉で培養するとリポキシゲナー

ゼが誘導されるという報告がみられるが、この現象は本研究における新種ラッカーゼがメラニンによって誘導される発見と類似している。即ち、環境の変化に呼応して、その微生物が反応したものと考えられ、それぞれ、酸化酵素として、過剰になった基質・生成物を代謝する一種の生体防御反応を演じているものと推定される。

(スペースを含め 3879 文字)