

# 脳卒中易発症ラットのコレステロール合成 低下に関与するメバロン酸ニリン酸 脱炭酸酵素の生化学的研究

道 原 明 宏

## Biochemical Studies of Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase Involved in the Reduced Cholesterol Biosynthesis in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat.

Akihiro Michihara

### ABSTRACT

Epidemiological studies have indicated a negative association between serum cholesterol level and the incidence of cerebral hemorrhage in man. The serum cholesterol level of Spontaneously hypertensive rat (stroke-prone) (SHRSP) is lower than that of normotensive Wistar Kyoto rat (WKY). The lower activity of mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD) was responsible for the reduced cholesterol biosynthesis in the liver of SHRSP. In this review, we found that the lower activity of MPD was caused by the reduced amount of this enzyme in SHRSP.

### はじめに

脳卒中は脳の血管障害により、急激な意識障害や神経症状を呈する疾患である。脳卒中は脳出血、脳梗塞、クモ膜下出血などに分類される。脳出血は長期にわたる高血圧で脳の細小動脈壁に壊死が起こり、血管が破裂して出血する。一方、脳梗塞には皮質枝型と穿通枝型の二つのタイプが存在する。皮質枝型は高コレステロールによる動脈硬化が、また穿通枝型は栄養障害からくる血管壊死による血栓形成が原因で梗塞がおこる。

これまでの研究で明らかにされた脳卒中の発症因子として第一義的に重要なものは高血圧である。しかし、これ以外にコレステロール不足が原因で脳卒中が誘起されることが疫学的

調査により明らかになされてきた<sup>1-3)</sup>。MRFIT (multiple risk factor intervention trial) による大規模な疫学調査によると、血中総コレステロール値が増加するにつれ総死亡率も増加するが、コレステロール値が減少すれば総死亡率も減少するのではなく、ある濃度から総死亡率はまた増加することが明らかにされた (Fig. 1)<sup>1)</sup>。つまり、コレステロールは高す

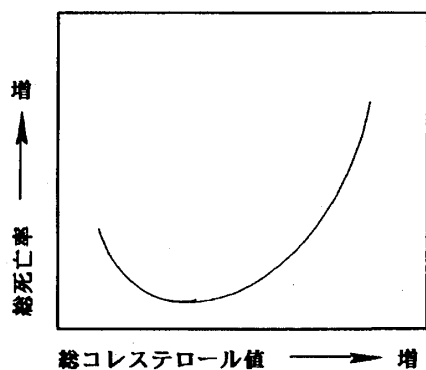


Fig. 1. 総コレステロールと死亡率  
(文献1より改変)

mg/dl	< 160	160-199	200-239	> 240
狭心症 心筋梗塞	1.0	1.32	1.99	3.03
脳梗塞	1.0	0.91	1.14	1.54
クモ膜下 出血	1.0	1.64	1.36	1.21
脳出血	1.0	0.44	0.46	0.43

Table 1. コレステロールと各病気の相対的  
危険度 MRFIT, 12年追跡, 350,977人  
(35-57才、男性) (文献1より改変)

ぎるのはもちろん低すぎるのも危険であることが明らかにされた。Table 1 はコレステロール値 160 mg/dl 未満のヒトの死亡原因となった病気の発症率を 1 とした場合の、各グループでの相対的危険度を示している。これを見ると、虚血性心疾患、脳梗塞による死亡危険度は高コレステロール群で増加しているが、脳出血ではむしろ高コレステロール群で減少していた。このように、脳卒中の中でも脳出血はコレステロール低下に起因していることが示唆された。

岡本、家森らは Wistar-Kyoto 系ラット (正常血圧ラット; WKY) から選択交配により、高血圧自然発症ラット (SHR) を分離し、さらに SHR のうち比較的脳卒中をきたしやすい家系をあらかじめ多数交配し子孫を数代得ておき、親が脳卒中を自然発症した子孫のみ残すという特殊な選択交配により 100% 脳卒中を自然発症するモデルラット、脳卒中易発症ラット (SHRSP) を確立した<sup>4,5)</sup>。その病理学的所見はヒトのそれと酷似していることからヒト脳卒中の研究に広く用いられている。

SHRSP 中の血清コレステロールは、WKY に比べ低下していることが報告されている<sup>6)</sup>。さらに、SHRSP において、コレステロールの少ない餌を摂取させたグループはコレステロールをある程度与えたグループより、脳卒中の原因の 1 つである血管壁の平滑筋細胞壊死に陥りやすいことが確かめられた<sup>7)</sup>。これらの結果より、SHRSP の血清コレステロール低下は脳卒中の 1 つの原因である可能性が強く示唆された。

SHRSP の血清コレステロール減少の原因を解明するために、コレステロールの 1) 吸収、2) 排泄、3) 合成に関する研究が行なわれた。1) WKY に比べ SHRSP において、コレ

ステロールが吸収されやすい傾向にあるが<sup>8)</sup>、2) ラベルしたコレステロールの血中からのクリアランスを検討したところ、WKY より SHRSP の方が緩やかに除かれることが報告されている<sup>9)</sup>。また、コレステロールから胆汁酸形成への律速段階の酵素である  $7\alpha$ -ヒドロキシダーゼ活性は、WKY、SHRSP 共に類似した値を示した<sup>10)</sup>。しかし、3) SHRSP の肝抽出物の酢酸からコレステロールへの合成能力は、WKY に比べ低下していることが報告されている<sup>6)</sup>。従って、SHRSP 中の減少した血清コレステロールは、肝におけるコレステロール合成能力低下に起因していることが強く示唆された。

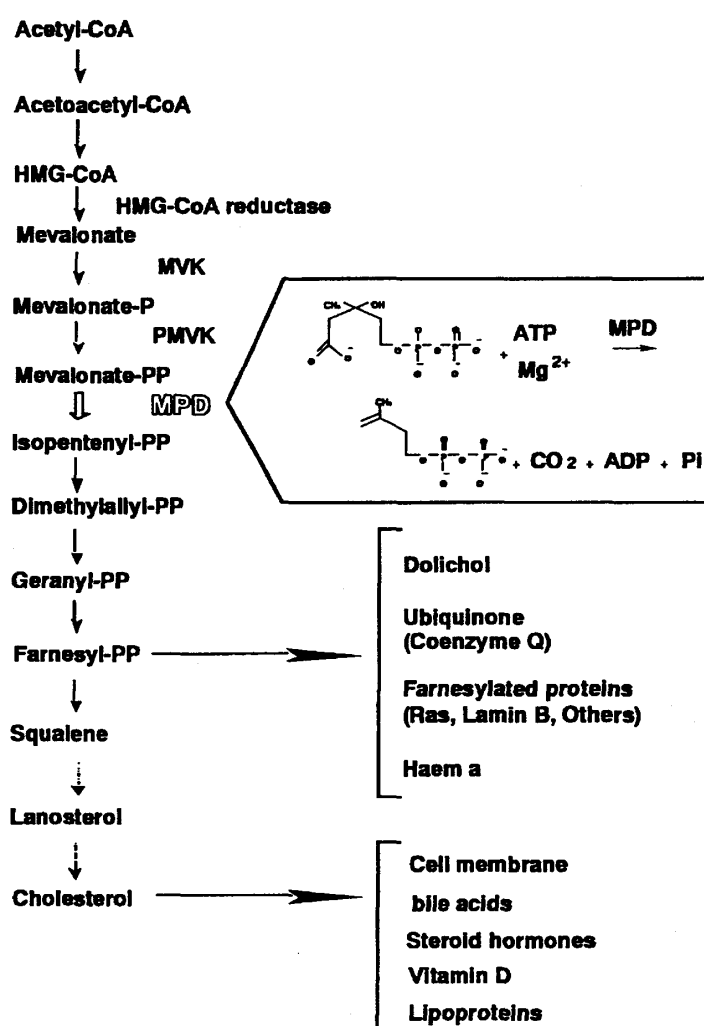


Fig. 2. コレステロール合成経路と MPD の酵素反応

Fig. 2 はコレステロール合成経路を示している。アセチル-CoA は少なくとも 32 段階の酵素過程を経てコレステロールへ変換されて行くことが知られている<sup>11)</sup>。メバロン酸はリン酸化と脱炭酸化により、ステロイド骨格を組み立てるためのブロックにあたるイソペンテニルピロフوسفェイト (IPP)、すなわちイソプレノイド単位へ変換される。次に、こ

の単位の6個が縮合されて中間体であるスクアレンが形成され、それからさらにステロイド骨格の母体であるラノステロールが生じる。コレステロールはさらに幾つかの段階を経て形成される。この経路の律速段階はHMG-CoAをメバロン酸へ変換するHMG-CoA還元酵素であり<sup>12, 13)</sup>、多くの抗高脂血症薬はこの酵素をターゲットとしてデザインされている。合成されたコレステロールは細胞膜への供給、あるいは胆汁酸、ステロイドホルモン等の前駆体として用いられる。また、この経路の中間代謝産物であるファルネシルピロフォスフェイト (FPP) は生体成分に必要なドリコール、コエンザイムQ、ファルネシル化されたタンパク質、ヘムa等に対して部分的に用いられる<sup>11)</sup>。

澤村らの報告によると、コレステロール合成に関与する酵素活性をWKYとSHRSPで比較した結果、HMG-CoA還元酵素では有意な差が認められず、さらに、メバロン酸キナーゼ (MVK)、ホスホメバロン酸キナーゼ (PMVK) においても有意な差は認められなかった。しかし、メバロン酸ニリン酸 (MVAPP) をIPPへ変換する酵素、メバロン酸ニリン酸脱炭酸酵素 (MPD) の活性減少が細胞質画分中で明らかにされた<sup>14)</sup>。肝抽出物を用いてMPDキネティクス (MVAPPに対する) を検討した結果、Km値はほぼ類似した値を示したが、SHRSP中のVmax値はWKYの約1/4であった。これらの事実から、SHRSPにおける肝のコレステロール合成低下と血清コレステロール減少を引き起こす原因としてMPD活性減少が重要であると示唆された。

MPDはATPとマグネシウム (Mg) の存在のもとに、MVAPPをIPPへと変換する時に脱炭酸反応を行う酵素であり、HMG-CoA還元酵素と並んでコレステロール合成調節に関与していることが報告されている (Fig 2)<sup>15-18)</sup>。この酵素は種々の動植物から精製されている<sup>19-26)</sup>。ラット肝において、Tothらは45 kDaのホモダイマー<sup>25, 27)</sup>、また、Shama Bhatらは35 kDaのホモテトラマー<sup>24)</sup>であると、分子量の異なる2つのMPDが報告されているが、これら2つのMPDの関係については明らかにされていない。また、ラット肝から精製されたMPDを用いた諸性質の検討は、35 kDa MPDでは行なわれているが、45 kDa MPDに関しては詳細に行なわれていない。

本稿の目的はSHRSPのMPD活性減少機構を解明することにあるが、前述のように不明な点の多いMPDに関する諸性質を明らかにしなければ、詳細な比較検討は行えない。そこで、本稿においてはまず、WKYのMPDに関する構造並びに生化学的性質を明らかにし、その上でSHRSPと比較することによってMPD活性減少の原因を明らかにする。

## 1. WKYからのMPD精製

Tanakaらは、プラバスタチンとコレステラミンを含む餌を摂取させたラット肝において、MVKが著明に増加することを見いだした<sup>28)</sup>。この報告に従い、前述の薬物の濃度をそれぞれ変えた餌を異なる日数で摂取させ、ラット肝でのMPD活性を比較した。その結果、5%

コレステラミンと0.1% プラバスタチンを含む餌 (CP diet) を12日間摂取させたラット肝のMPD活性は、普通食を摂取させたラットと比較して10倍の最大活性を示した (Fig. 3)。そこで、CP diet を12日間摂取させたラット肝 (15匹) から種々のカラムクロマトグラフィーを用いてMPDを精製した結果、2種類のMPD活性を保持したタンパク質 (45 kDa と 37 kDa) が精製された (Fig. 4, Table 2)。

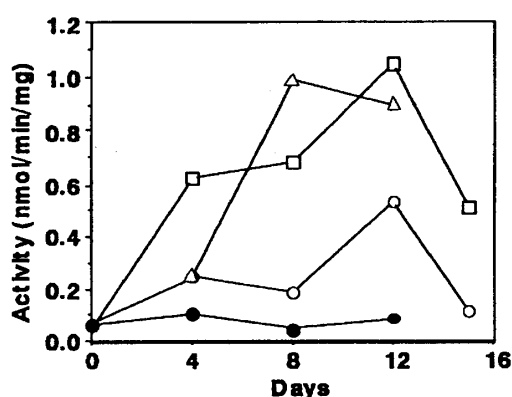


Fig. 3. WKY 肝 MPD の活性誘導

- (●) 普通食
- (○) 5% コレステラミン
- (□) 5% コレステラミンと  
0.1% プラバスタチン
- (△) 5% コレステラミン  
0.5% プラバスタチン

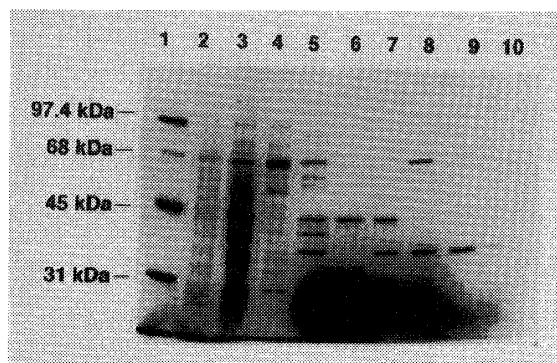


Fig. 4. SDS-PAGE による各精製過程の純度検定

- 1, マーカ酵素, 2, 肝抽出物,
- 3, 35-60% 硫酸画分, 4, QAE 活性画分,
- 5, ブルーセファロース活性画分,
- 6, ハイドロキシアパタイト (活性画分A)
- 7, ハイドロキシアパタイト (活性画分B)
- 8, ハイドロキシアパタイト (活性画分C)
- 9, 8 をフェニルセファロースにかけ、溶出させた活性画分, 10, 9 をハイドロキシアパタイトにかけ、溶出させた活性画分

Table 2. WKY 肝からの MPD 精製

Purification Step	Total protein (mg)	Total units (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
QAE	310	126	0.4		100
Blue Sepharose	31.6	65	2.9	5.0	52
Hydroxyapatite A	1.13	9.0	8.0	20.0	7.1
Hydroxyapatite B	3.00	27.9	9.3	23.3	22.1
Hydroxyapatite C	5.46	25.1	4.6	11.5	19.9
Phenyl Sepharose	0.81	9.89	12.4	31.0	7.8
2nd Hydroxyapatite	0.17	1.26	7.4	18.5	1.0

## 2. 45 kDa と 37 kDa MPD の免疫学的並びに構造学的解析の比較

45 kDa と 37 kDa MPD の構造上の相違点を検討するために、精製した 45 kDa MPD に対する抗血清を家兎を用いて作製した。45 kDa と 37 kDa MPD の精製タンパクを SDS-PAGE した後、この抗血清を用いてイムノブロットした結果、精製した 45 kDa MPD だけでなく 37 kDa MPD にも反応した (Fig. 5)。抗血清中には複数の抗体が存在していること

から、これら2種類のMPDが、各々異なる抗体に反応している可能性も考えられる。ゆえに、45 kDa MPDを抗原として、精製抗体を調製した。しかし、精製抗体を用いた場合も、37 kDa MPDと反応した（データ未掲載）。これらの結果より、45 kDaと37 kDa MPDは免疫学的に類似していることが明らかになった。

そこで、この抗血清を用いてラット肝抽出物に含まれているMPDについて検討したところ、CP dietで処理したラット肝には、45 kDaと37 kDa MPDの両方が検出された（Fig. 5）。ところが、処理していないラット肝抽出物には37 kDa MPDは検出されず、45 kDa MPDのみ検出された。また、処理していないラット肝抽出物に比べて、CP dietで処理したラット肝抽出物の45 kDa MPD量は酵素活性と同様著しく増加していた（Fig. 5）。

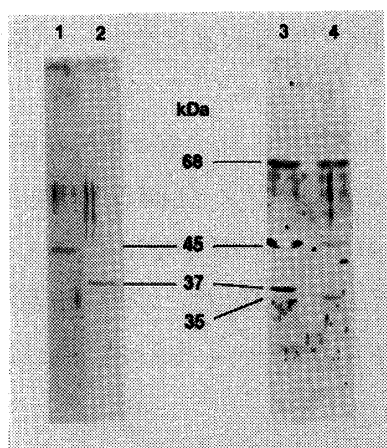


Fig. 5. 45 kDa MPD に対するポリクロナール抗体を用いたイムノブロット解析

- 1, 45 kDa MPD 精製タンパク
- 2, 37 kDa MPD 精製タンパク
- 3, CP diet で処理した肝抽出物
- 4, 未処理の肝抽出物

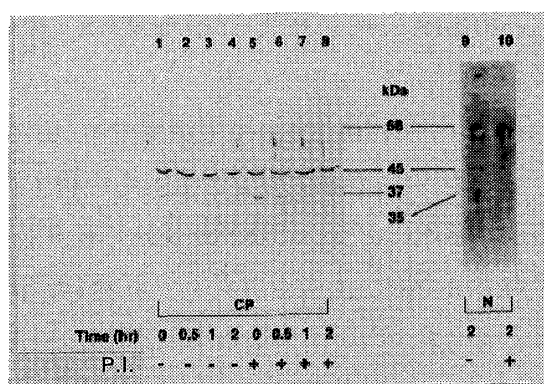


Fig. 6. プロテアーゼによる影響

CP diet処理(CP)あるいは未処理(N)のラット肝をリン酸緩衝液(P.I.-)あるいはプロテアーゼ存在下中(P.I.+)でホモジネートした後、経時的にインキュベートした。そのホモジネートの20,000xg上清をイムノブロットにより解析した。

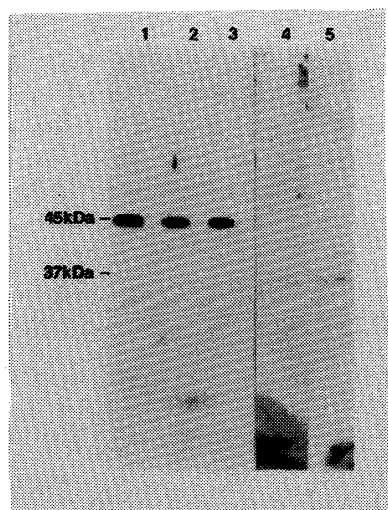
45 kDaと37 kDa MPDは免疫学的性質が非常に類似していることから、1) 37 kDa MPDは精製過程に、45 kDa MPDからプロテアーゼなどにより切断されて現れてくる。2) 45 kDa MPDが糖鎖を含んでおり、糖鎖の切断により37 kDa MPDが生じた。3) ペルオキシゾームに37 kDa MPDが存在し、CP dietにより細胞質へ現れてきた。4) CP dietにより誘導されて37 kDa MPDが生じた。という4つの可能性が考えられた。

プロテアーゼの影響を確かめるために、CP dietで処理したラット肝ホモジネートを種々のプロテアーゼインヒビター存在下および非存在下でインキュベートした後、20,000 x g上清をイムノブロットにより解析した。種々のプロテアーゼインヒビター存在下でさえ、45 kDaと37 kDa MPDが検出された。また、逆にリン酸緩衝液だけでホモジネートし、2時間インキュベートした時においても、37 kDa MPDは増加しなかった（Fig. 6, CP）。さらに、CP dietで処理していないラット肝においては、種々のプロテアーゼインヒビターの有無に

関りなく、37 kDa MPD は検出されなかった (Fig. 6, N)。以上の結果から、37 kDa MPD は精製過程中において、プロテアーゼにより 45 kDa MPD から切断されて生じたのではないと結論づけた。

次に、45 kDa と 37 kDa MPD の分子量の違いは糖鎖の切断によるか否かについて検討した。N-グリカナーゼは複合型あるいはハイマンノース型のN-結合型糖鎖を切断する酵素であり<sup>29)</sup>、ノイラミニダーゼは複合型のシアル酸を切断する酵素である<sup>30)</sup>。MPD が N-結合型糖鎖を含んでいるか否かを確かめるために、精製した MPD をこれらの酵素で処理した。Fig. 7 に示すように、N-グリカナーゼあるいは、ノイラミニダーゼで処理したときにおいても、45 kDa と 37 kDa MPD 共に、未処理のバンドからシフトしなかった。さらに、シッフ染色においても、45 kDa と 37 kDa MPD 共に、染色されなかった (データ未掲載)。これらの結果は 45 kDa と 37 kDa MPD 共に、N-結合型糖鎖付加は存在しないことを示している。

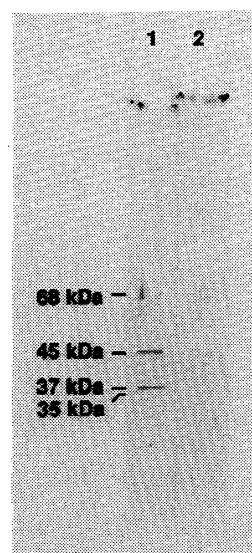
Stamellos らは細胞質とペルオキシゾームにそれぞれ存在する分子量の異なる MVK を報告している<sup>31)</sup>。ペルオキシゾームに存在する MVK はメビノリン (HMG-CoA 還元酵素阻害剤) 処理により、細胞質へ現れて来ることが示されている。37 kDa MPD は、CP diet を摂取させたラット肝ホモジネートの 20,000 x g 上清に検出された。この上清画分には細胞質とミクロゾームが含まれている<sup>32)</sup>。ゆえに、ペルオキシゾーム中の 37 kDa MPD の存



**Fig. 7. MPD の糖鎖解析**

精製した酵素を N-グリカナーゼあるいはノイラミニダーゼ処理した後、イムノプロットにより解析した。

- 1, ノイラミニダーゼ (45 kDa)
- 2, N-グリカナーゼ (45 kDa)
- 3, 未処理の 45 kDa
- 4, N-グリカナーゼ (37 kDa)
- 5, 未処理の 37 kDa



**Fig. 8. 20,000xg 沈澱画分のイムノプロット解析**

- 1, CP diet 処理したラット肝20,000xg上清画分
- 2, 未処理のラット肝20,000xg 沈澱画分

在場所を確かめる必要がある。CP diet で処理していないラット肝ホモジネートを 20,000 x g で 20 分間遠心を行い、得られた沈殿物（核、ペルオキシゾーム、ミトコンドリア、リソゾームを含む画分）を溶解した後、精製抗体を用いてイムノブロットを行った。その結果、少量の 45 kDa MPD と 35 kDa タンパク質が検出されたが、37 kDa MPD は検出されなかった（Fig. 8）。以上の結果から、通常では 45 kDa MPD が細胞内に存在し、37 kDa MPD は CP diet により誘導されることが示唆された。

### 3. SHRSP からの MPD 精製と免疫学的解析の比較

SHRSP の肝 MPD 活性減少の原因として、1) アミノ酸配列の変化、2) タンパク量の減少、3) 阻害物質の存在、が考えられる。アミノ酸配列の変化は MPD の性質に大きな違いをもたらす可能性がある。ゆえに、精製タンパクを用いた WKY と SHRSP の性質の比較を行うために、SHRSP から MPD を精製する必要がある。そこで、まず WKY 肝からの MPD 精製方法に従い、プラバスタチンとコレステラミンを含む餌を摂取させた SHRSP の MPD 活性を検討した。Fig. 9 は、薬物の組み合わせと、濃度をそれぞれ変えたプラバスタチンとコレステラミンを摂取させた SHRSP 肝抽出物の MPD 活性を示している。WKY と同様（Fig. 3）、CP diet を 12 日間摂取させたラット肝の MPD 活性は、普通食を摂取させ

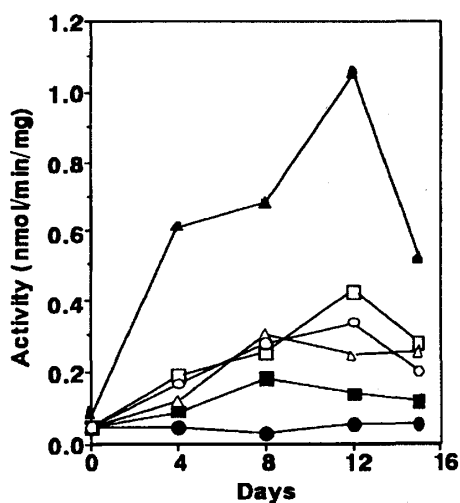


Fig. 9. SHRSP 肝 MPD の活性誘導

- (●) 普通食
- (■) 5% コレスチラミン
- (□) 5% コレスチラミンと 0.1% プラバスタチン
- (△) 5% コレスチラミン 0.5% プラバスタチン
- (○) 10% コレスチラミンと 0.5% プラバスタチン
- (▲) 5% コレスチラミンと 0.1% プラバスタチン (WKY)

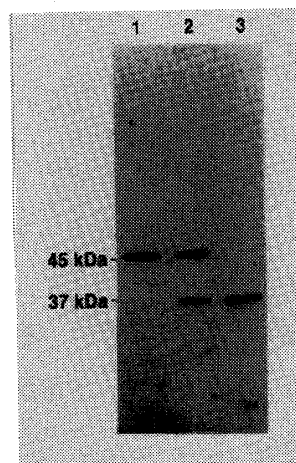


Fig. 10. SHRSP 肝からの MPD 精製

- 1, 45 kDa MPD (SHRSP)
- 2, 45 kDa 37 kDa MPD (WKY)
- 3, 37 kDa MPD (SHRSP)



たラットと比較して、10 倍の最大活性を示した。しかし、この最大活性は WKY の 1/2 の値であった。

CPdiet を 12 日間摂取させた SHRSP 肝 (20 匹) から MPD を精製した結果、WKY と同様 2 種類の MPD 活性を保持したタンパク質 (45 kDa と 37 kDa) が精製された (Fig. 10)。次に WKY の場合と同様、免疫学的検討を行った。CP diet で処理した WKY、SHRSP 肝から各々精製された 45 kDa MPD の等量を WKY の 45 kDa MPD に対して作製した抗血清を用いて、イムノブロットにより解析したところ、SHRSP の 45 kDa MPD もこの抗体と反応した (Fig. 11)。45 kDa のバンドをクロマトスキャナーで測定した結果、WKY、SHRSP 共に同じ強さでバンドが反応した (WKY, 0.69 arbitrary unit/ $\mu$ g; SHRSP, 0.72 arbitrary unit/ $\mu$ g)。この結果から、WKY と SHRSP の 45 kDa MPD 共に、免疫学的に類似しており 45 kDa MPD に対して WKY と SHRSP の間で量的比較を行えるとが示された。次に、CP diet で処理した SHRSP 肝抽出物を抗血清を用いてイムノブロットした結果、45 kDa と 37 kDa MPD の両方が検出された。しかし、処理していないラット肝抽出物には 37 kDa MPD は検出されず、45 kDa MPD のみ検出された

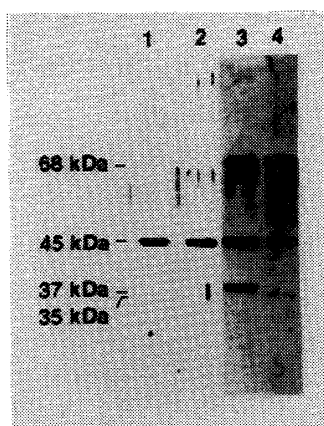


Fig. 11. SHRSP 肝 MPD のイムノブロット解析

- 1, 精製した 45 kDa MPD (WKY, 60ng)
- 2, 精製した 45 kDa MPD (SHRSP, 60ng)
- 3, CP diet で処理した肝抽出物 (SHRSP)
- 4, 未処理の肝抽出物 (SHRSP)

(Fig. 11)。さらに、処理していないラット肝ホモジネートの 20,000 x g 沈殿物にも、37 kDa MPD は検出されなかった (データ未掲載)。ゆえに、WKY と同様、SHRSP においても、通常は 45 kDa MPD が存在しており、CP diet により 37 kDa MPD が産生されることが示唆された。ゆえに今後は、45 kDa MPD を中心に、WKY と SHRSP の性質の比較を行っていく。

#### 4. WKY、SHRSP の MPD の性質の比較

Table 3 に SHRSP と WKY から得られた MPD の酵素学的性質をまとめて示している。MVAPP 並びに ATP に対する  $K_m$  値、至適 pH、Native 分子量は、WKY、SHRSP 共にほとんど類似していた。

しかし、WKY の 45 kDa MPD の半最大活性を示す Mg の  $K_m$  の値は 1.50 mM であった。

Table 3. 45 kDa MPD の性質の比較

	45 kDa MPD	
	WKY	SHRSP
MVAPP (Km; $\mu$ M)	22.7 $\pm$ 2.2	22.7 $\pm$ 2.5
(Vmax; $\mu$ mol/min/mg)	7.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.5
ATP (Km; mM)	0.71 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.03
(Vmax; $\mu$ mol/min/mg)	5.5 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.8
Affinity for Mg <sup>2+</sup> (Km; mM)	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Optimum pH	7.0	7.0
pI	5.8	5.0
Native M.W. (kDa)	90	90

<sup>a</sup> Significantly different. P<0.0005. (N=3).

Table 4. 45 kDa MPD のカチオン、ヌクレオチド依存性

Cation (5mM)	45 kDa MPD	
	WKY	SHRSP
MgCl <sub>2</sub>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
MgCl <sub>2</sub>	126	39
MgCl <sub>2</sub>	125	98
MgCl <sub>2</sub>	55	48
MgCl <sub>2</sub>	33	7
MgCl <sub>2</sub>	21	10
KCl	16	11
NaCl	21	10
None	9	11

45KDa MPD 活性

a, 5.6, b, 4.1 ( $\mu$ mol/min/mg)

また、SHRSP においては 0.52 mM であった。これらの結果は SHRSP の Mg に対する親和性が、WKY に比べ高いことを示している。また、SHRSP の MPD の等電点は WKY の等電点 (WKY, pH 5.6; SHRSP, pH 5.0) に比べ幾分減少していた。

カチオン、ヌクレオチドの影響について検討したところ、WKY の 45 kDa MPD 活性は、マンガン (Mn) 又は コバルト (Co) の存在下において、Mg より高い活性を示した (Table 4)。これに対して、SHRSP の 45 kDa MPD 活性は Mn の存在下において、Mg に比べ約 60% 減少していた。このような WKY と SHRSP のカチオン依存性の違いは、本酵素のカチオン結合領域の構造変化を示唆している。

以上の結果より、WKY と SHRSP の間で性質の比較を行ったが、カチオン依存性の違いを除けば、非常に類似した性質を示した (Table 3)。従って、WKY と SHRSP 肝において MPD 活性の差を酵素タンパクの構造の差に帰することはできない。そこで、次にタンパク量の比較を行った。

## 5. WKY、SHRSP 中の MPD における、タンパク量の比較

まず、各組織抽出物の 45 kDa MPD 量を定量的に測定するために、WKY から精製した 45 kDa MPD を段階的に希釈し、イムノブロットを行った (Fig. 12)。用いたタンパク量に依存してシグナルは増加し、これをクロマトスキャナーにより定量したところシグナルは、5–110 ng の間で直線性を示した (Fig. 12)。

Fig. 13 は各組織抽出物の MPD のイムノブロットを行い、定量的に測定した結果を示している。WKY と比較したとき、SHRSP の脳と肝で、45 kDa MPD 量の減少が認められたが、精巣では差が認められなかった。また、各組織抽出物の酵素活性を WKY と SHRSP で比較したとき、タンパク量同様 SHRSP の脳と肝で活性減少が認められたが、精巣では差が認められなかった。。これらの結果より、SHRSP の脳と肝抽出物の MPD は活性同様タンパク量も減少していることが明らかになった。

これらの結果を基にして、各組織抽出物の活性と 45 kDa MPD のタンパク量から、酵素

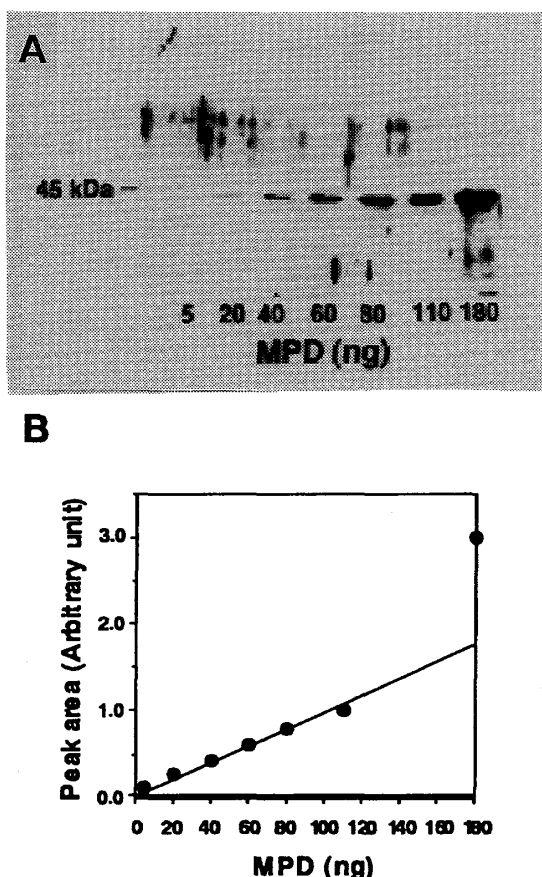


Fig. 12. 45 kDa MPD の用量依存曲線  
A, 精製した 45 kDa MPD (5-180 ng)  
をイムノプロットにより解析した  
B, A のシグナルをクロマトスキャナー  
により定量的に測定した

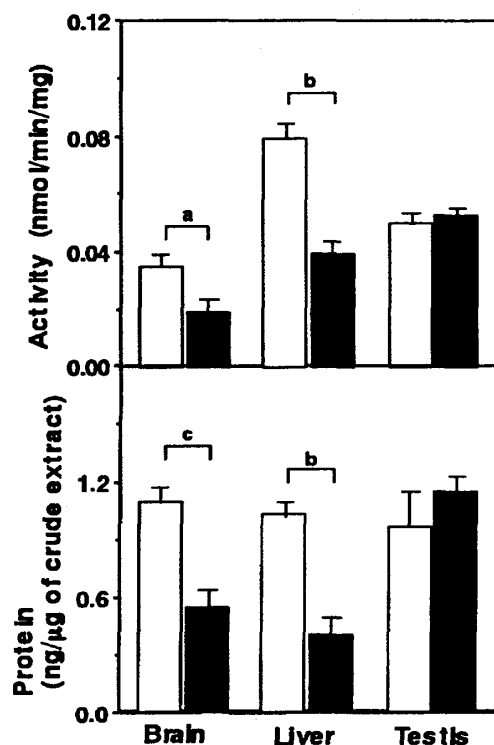


Fig. 13. 各組織抽出物のMPD活性測定と  
定量  
WKY (□) and SHRSP (■).  
Significantly different.  $P < 0.05$  (A);  $P < 0.001$  (b);  $P < 0.01$  (c). means  $\pm$  S.D. N=3.

Table 5. 各組織抽出物の 45 kDa MPD 比活性の比較

	WKY			SHRSP		
	Activity/tissue (nmol/min/mg)	Amount/tissue ( $\mu$ g/g)	Activity/amount (nmol/min/mg)	Activity/tissue (nmol/min/mg)	Amount/tissue ( $\mu$ g/g)	Activity/amount (nmol/min/mg)
Brain	$0.43 \pm 0.03$	$15.6 \pm 3.60$	$28.0 \pm 4.30^a$	$0.27 \pm 0.05$	$8.1 \pm 1.57$	$33.4 \pm 0.90^c$
Liver	$3.74 \pm 0.36$	$54.2 \pm 5.70$	$69.1 \pm 4.90^{a,b}$	$1.78 \pm 0.27$	$24.2 \pm 1.95$	$73.9 \pm 5.30^{c,d}$
Testis	$1.62 \pm 0.02$	$38.5 \pm 1.90$	$43.0 \pm 1.50^b$	$1.53 \pm 0.08$	$37.5 \pm 1.50$	$43.1 \pm 1.35^d$

<sup>aa,cc</sup> Significantly different,  $P < 0.001$ ; <sup>bb,dd</sup> Significantly different,  $P < 0.05$ . (n=3).

1 mg 当たりの“45 kDa MPD 比活性”を算出した (Table 5)。脳、肝、精巣の組織において、WKY と SHRSP の間で “45 kDa MPD 比活性”を比較した結果、有意な違いは認められなかった。この結果は WKY と SHRSP の間で酵素自身の触媒能力に差がないことを示している。以上の結果より、肝抽出物の MPD 活性減少はタンパク量の減少が主要な原因であると示唆された。一方、同一ラットの各組織の “45 kDa MPD 比活性”を比較した場合、肝で最も高く、脳で最も低い値を示したことから、これらの組織に未知の MPD 活性調

節因子が含まれている可能性が考えられる。本酵素の翻訳後活性調節機構については明らかにされていないが、HMG-CoA還元酵素の活性はリン酸化、非リン酸化により調節されることが知られている<sup>33)</sup>。しかし、もしこのような因子が存在したとしても、これで、WKYとSHRSPの活性の差を説明することはできない。

#### 6. WKY、SHRSPの45 kDa MPDにおける、組織内分布の比較

前述で述べたように、SHRSPの脳、肝のMPDは有意に減少していたが、精巣では差が認められなかった。そこで、WKY、SHRSPの他の組織の粗抽出物に含まれるMPD量を比較した (Fig.14)。イムノプロットのシグナルはクロマトスキャナーにより定量した。

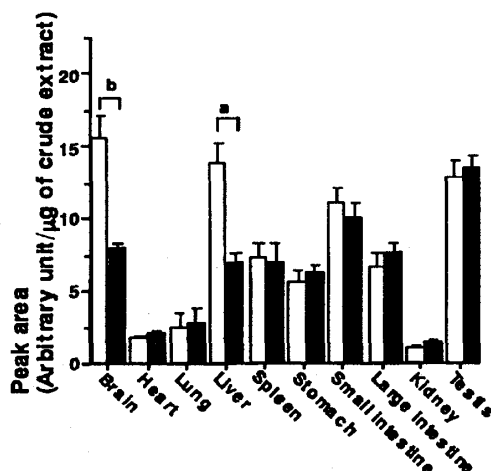


Fig. 14. 45 kDa MPD の組織分布の比較  
WKY (□) and SHRSP (■).  
Significantly different,  
 $P < 0.05$  (a);  $P < 0.01$  (b).  
means  $\pm$  S.D. n=4.

WKYにおいて抽出物1  $\mu$ g中のMPD量が、多く含まれている組織は脳、肝臓、小腸、精巣など、コレステロール合成が盛んな組織に一致していた。また、腎臓、心臓、肺では少量しか含まれていなかった。WKYとSHRSPを比較すると、脳と肝以外の他の組織では著しい差は認められなかった。脳は全身のコレステロールの約1/4を含み、それを全て脳自身で合成していることが一般的に受け入れられている<sup>34, 35)</sup>。一方、肝は各組織へ供給されるコレステロールの主たる合成臓器である。従って、SHRSPの脳、肝のMPD減少は全身のコレステロール減少を引き起こすとともに、このラットの脳の機能に重要な影響を及ぼす可能性が考えられた。

#### 7. WKY、SHRSPの脳、肝のMPDにおける週齢の比較

SHRSPの脳においてMPD量が減少していることは、このラットの髄鞘形成に何らかの影響を及ぼす可能性がある(髄鞘の主成分はコレステロール)。髄鞘形成は生後1週間が最も盛んであることが知られているため<sup>36)</sup>、幼年期におけるMPD量について検討した (Fig. 15)。脳において、WKY、SHRSP共に、MPD量は1週齢で高い値を示し、その後、3週齢までしだいに減少し、以後9週齢まではほぼ一定であった。WKYとSHRSPを比

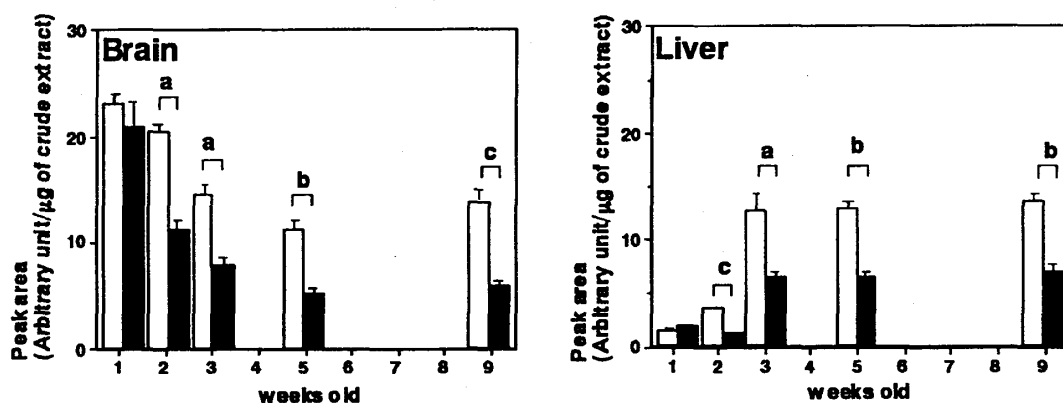


Fig. 15. 脳、肝における 45 kDa MPD の週齢の比較  
WKY (□) and SHRSP (■). Significantly different,  $P < 0.05$  (a);  $P < 0.01$  (b);  $P < 0.001$  (c).  
means  $\pm$  S.D.  $n = 4$ .

較すると 1 週齢においては有意な差は認められなかったが、2 週齢以後、SHRSP では半減していた。これに対し、肝においては、WKY、SHRSP 共に、1、2 週齢では低い値を示したが、離乳期に当たる 3 週齢で上昇し、9 週齢まで一定の高い値を示した (Fig. 15)。この場合も SHRSP の有意な減少は 2 週齢から認められた。SHRSP の髄鞘形成についての報告は筆者の知る限りないが、この結果は少なくとも 1 週齢においては MPD の減少は認められず、髄鞘形成に悪影響を及ぼしているとは考えられない。2 週齢から MPD 量の減少が認められることについては、この時期にその発現を調節する機構に何らかの異常があると考えられるが、詳細は不明である。

コレステロール合成の盛んな時期である 1、2 週齢の脳、あるいは 3 週齢の肝での 37 kDa MPD 産生を期待したが検出されなかった。ゆえに、現時点において、37 kDa MPD 産生の病理的意義はないと考えている。

## 考察

これまで MPD の精製についてはいくつかの報告がされているが、分子量の点からこれらを大別すると、40–45 kDa のものと 35 kDa の 2 種類に区別される<sup>19–26)</sup>。前者については鶏肝より Jabalquinto らの精製したものが最も詳しくその性質が調べられており<sup>26)</sup>、また、ラット肝からも Toth らにより精製されている<sup>25)</sup>。これに対して、後者の MPD は Shama Bhat らがラット肝から精製したもので<sup>24)</sup>、テトラマーであること (他方はダイマー)、非常に不安定であることなど、幾つかの点で前者の MPD とは性質を異にしている。本稿で得られた 2 つの MPD のうち 45 kDa MPD はサブユニット構造、酵素学的諸性質、カチオンおよびヌクレオチド依存性などの点から、他の報告に見られる 40–45 kDa MPD に一致するものと考えられる。一方、37 kDa MPD については Shama Bhat の 35 kDa MPD と SDS-

PAGE 上の分子量、および MVAPP に対する  $K_m$  値 (37 kDa MPD, 20 mM; 35 kDa, 10 mM) が近い値を示しているが、37 kDa MPD は普通食摂取のラットには認められず、また、35 kDa MPD のように不安定でもないことから 37 kDa MPD は 35 kDa MPD とは異なるものと考えられる。この点に関して興味深いのは、抗 45 kDa MPD 血清と反応する肝抽出物の 35 kDa タンパク質である。このタンパク質は Fig. 6 に示したように、肝抽出物の 45 kDa MPD が分解して生じたものでもなく、また、精製過程中において活性画分を形成しないことから、MPD ではないと考えられる。しかし、Shama Bhat らの非常に不安定な 35 kDa MPD が精製過程中に失活した可能性もあり、今後の検討を要する。

SHRSP の肝抽出物の MPD 活性減少の原因として、酵素の質的变化が考えられる。CP diet で処理した SHRSP から MPD を精製すると、WKY 同様 2 種類の MPD が得られた (Fig. 10)。SHRSP の MPD は、WKY と同様に通常は 45 kDa のホモダイマーとして存在し、CP diet により、37 kDa MPD が産生された。WKY と SHRSP の 45 kDa MPD を比べると分子量、サブユニット構造、MVAPP と ATP に対する  $K_m$  値、至適 pH、等電点、などの性質はほぼ類似していた (Table 3)。しかし、二価カチオンに対する MPD の親和性について違いが示された (Table 4)。このカチオン依存性に対する違いから、SHRSP の 45 kDa MPD のカチオン結合領域の配列変化が考えられた。以上の結果より、SHRSP の 45 kDa MPD はカチオン依存性を除けば、本質的に WKY の 45 kDa MPD と性質が類似していることが明らかになった。ゆえに、SHRSP の肝抽出物の MPD 活性減少は、酵素の質的な違いでは説明できない。

そこで、次に WKY と SHRSP の脳、肝、精巣抽出物の 45 kDa MPD 量をイムノブロットにより、定量的に測定した (Fig. 13)。SHRSP の脳と肝抽出物において、活性と同様 45 kDa MPD 量の減少が認められたが、精巣では差が認められなかった。また、WKY と SHRSP の各組織に対して、“45 kDa MPD 比活性”を算出したとき、WKY と SHRSP 共にほぼ同じ値が示された (Table 5)。これらの結果は、SHRSP の 45 kDa MPD 量減少により抽出物での活性減少が引き起こされていることを示している。タンパク量の減少が原因であるという筆者の結果は、SHRSP の肝抽出物の MPD の  $K_m$  値は変化なく、 $V_{max}$  値が減少しているという澤村らの報告と一致する<sup>14)</sup>。

この他に、肝抽出物の MPD 活性減少の原因として、阻害物質の存在が考えられる。WKY と SHRSP において、タンパク量、性質、共に同じで、SHRSP の抽出物の MPD 活性のみ減少しているのであれば、阻害物質の存在が活性減少の主要な原因として考えられるが、このような結果は得られなかった。以上の結果より、肝抽出物の MPD 活性減少は、タンパク量の減少が主要な原因であると結論づけられた。

SHRSP の 45 kDa MPD 量の減少として、1) 翻訳後、プロテアーゼによる 45 kDa MPD の減少、2) 発現量の低下が考えられる。発現量低下の主要な原因として、2-1) cis-

element 塩基配列の変化、2-2) 転写調節因子の差が考えられる。近年報告されているコレステロール合成系の転写因子として、最も理解されているのは SREBP ファミリー (SREBPs) である<sup>37-40)</sup>。この SREBPs は、LDL レセプター、HMG-CoA 合成酵素、FPP 合成酵素、スクアレン合成酵素、HMG-CoA 還元酵素などの転写促進に作用する<sup>39-45)</sup>。その中でも転写促進のメカニズムが最も理解されているのは、HMG-CoA 合成酵素と LDL レセプターである。SREBPs はこれら 2 つの遺伝子の 5' 側上流に位置する 10 bp の共通塩基配列 5' —ATCACCCCAC—3' (SRE-1) に結合し、転写を調節することが明らかにされている<sup>37-40)</sup>。このタンパクは膜結合型 (小胞体膜、核膜に存在) である前駆体の 125 kDa から、2 段階のプロテオリティックプロセッシングにより核内に移行できる成熟型の 68 kDa へと変換される。ステロールはこのプロセッシングを抑制し、また、成熟型の 68 kDa はカルシウム依存性プロテアーゼにより分解されることが知られている<sup>41, 46-49)</sup>。WKY と SHRSP の HMG-CoA 還元酵素活性を比較したとき、有意な差は認められなかったことから<sup>14)</sup>、HMG-CoA 還元酵素とは別の調節物質が MPD に関与している可能性もあるが、いずれにしても MPD が同様の転写調節をうけていることは十分考えられる。従って、SHRSP の MPD 活性低下の原因を明らかにするうえで、本酵素の転写調節機序を解明することは不可欠である。

脳はコレステロール量を多く含んだ組織であり、また、それは脳自身により合成されていることが一般的に受け入れられている<sup>34, 35)</sup>。しかし、近年では脳内コレステロールの一部を脳外から取り込んでいる報告もある<sup>50)</sup>。それゆえに SHRSP の脳卒中発症の 1 つのメカニズムとして、脳の MPD 量減少による脳内コレステロール合成低下、並びに肝における MPD 量減少による血清コレステロール低下の 2 つの減少機構により、脳内でのコレステロール低下が引き起こされ脳卒中を発症するのかもしれない。今後、さらに詳細な MPD 量減少の原因を探るとともに、ノックアウトマウスなどを用いて、MPD 活性減少と脳卒中の間の因果関係を直接検討する必要がある。

#### 謝辞

本研究は京都大学大学院人間・環境学研究科家森幸男教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導と御助言に厚く感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、直接御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院人間・環境学研究科澤村誠助手に深謝致します。

## 参考文献

1. Neaton, J. D., Blackburn, H., Jacobs, D., Kuller, L., Lee, D. J., Sherwin, R., Shih, J., Stamler, J., and Wentworth, D. (1992) Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the multiple risk factor intervention trial: Multiple risk factor intervention trial research group. *Arch. Intern. Med.* 152, 1490-1500
2. Tanaka, H., Ueda, Y., Hayashi, M., Date, C., Baba, T., Yamashita, H., Shoji, H., Tanaka, Y., Owada, K., and Datels, R. Risk factors for cerebral hemorrhage and cerebral infarction in a Japanese rural community. (1982) *Stroke* 13, 62-73
3. Kagan, A., Popper, J. S., Rhoads, G. G., and Yano, K. Dietary and other risk factors for stroke in Hawaiian Japanese men. (1985) *Stroke* 16, 390-396
4. Okamoto, K., Yamori, Y., and Nagaoka, A. (1974) Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Cir. Res.* 34/35, Suppl. 1, 143-153
5. Yamori, Y. (1977) in *Gene-Environment Interaction in Common Diseases* (Inoue, E., and Nishimura, H., eds) pp. 141-154, University of Tokyo Press, Tokyo
6. Iritani, N., Fukuda, E., Nara, Y., and Yamori, Y. (1977) Lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Atherosclerosis* 28, 217-222
7. Takayama, Y. (1975) *J. Jpn. Coll. Angiol.* 15, 455-465 (in Japanese)
8. Yamori, Y., Iritani, N., Nara, Y., Fukuda, E., and Mitani, F. (1978) Cholesterol metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Heart J.* 19, 665-666
9. Iritani, N., Nara, Y., and Yamori, Y. (1982) Cholesterol and bile acid metabolism in hypertensive arteriolipidosis-prone rats (ALR). *Jpn. Circ. J.* 46, 151-155
10. Yamori, Y., Kitamura, Y., Nara, Y., and Iritani, N. (1981) Mechanism of hypercholesterolemia in arteriolipidosis-prone rats (ALR). *Jpn. Circ. J.* 45, 1068-1073
11. Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430
12. Kennelly, P. J., and Rodwell, V. W. (1985) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by reversible phosphorylation-dephosphorylation. *J.*



Lipid Res. 26, 903-914

13. Beg, Z. H., Stonik, J. A., and Brewer, H. B. Jr. (1987) Modulation of the enzymic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by multiple kinase systems involving reversible phosphorylation: a review. *Metabolism* 36, 900-917
14. Sawamura, M., Nara, Y., and Yamori, Y. (1992) Liver mevalonate 5-pyrophosphate decarboxylase is responsible for reduced serum cholesterol in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J. Biol. Chem.* 267, 6051-6055
15. Ramachandran, C. K., and Shah, S. N. (1976) Decarboxylation of mevalonate pyrophosphate is one rate-limiting step in hepatic cholesterol synthesis in suckling and weaned rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 42-47
16. Ramachandran, C. K., and Shah, S. N. (1977) Studies on mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain. *J. Neurochem.* 28, 751-757
17. Jabalquinto, A. M., and Cardemil, E. (1980) Secondary regulatory sites in rat liver cholesterol biosynthesis: role of 5-pyrophosphomevalonate decarboxylase. *Lipids* 15, 196-198
18. Jabalquinto, A. M., and Cardemil, E. (1981) The effect of diabetes, nutritional factors, and sex on rat liver and kidney mevalonate kinase, mevalonate-5-phosphate kinase, and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 132-139
19. Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A. H., and de Waard, A. (1959) Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 234, 2595-2604
20. Dhe-Paganon, S., Magrath, J., and Abeles, R. H. (1994) Mechanism of mevalonate pyrophosphate decarboxylase: evidence for a carbocationic transition state. *Biochemistry* 33, 13355-13362
21. Skilleter, D. N., and Kekwick, R. G. O. (1971) The enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate 5-phosphate) in the latex of *hevea brasiliensis*. *Biochem. J.* 124, 407-417
22. Popjak, G. (1969) Enzymes of sterol biosynthesis in liver and intermediates of sterol biosynthesis. *Methods in Enzymol.* 15, 393-454
23. Chiew, Y. E., O' Sullivan, W. J., and Lee, C. S. (1987) Studies on pig liver mevalonate-5-diphosphate decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 916, 271-278
24. Shama Bhat, C., and Ramasarma, T. (1980) Purification & properties of

- mevalonate pyrophosphate decarboxylase of rat liver. *Indian J. Biochem. Biophys.* 17, 249-254
25. Toth, M. J., Huwyler, L., and Park, J. (1996) Purification of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 26, 47-51
  26. Jabalquinto, A. M., Eyzaguirre, J., and Cardemil, E. (1982) Purification and characterization of avian liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 21, 4646-4650
  27. Toth, M. J., and Huwyler, L. (1996) Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding human and yeast mevalonate pyrophosphate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 7895-7898
  28. Tanaka, R. D., Schafer, B. L., Lee, L. Y., Freudenberger, J. S., and Mosley, S. T. (1990) Purification and regulation of mevalonate kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265, 2391-2398
  29. Barsomian, G. D., Johnson, T. L., Borowski, M., Denman, J., Ollington, J. F., Hirani, S., McNeilly, D. S., and Rasmussen, J. R. (1990) Cloning and expression of peptide-N4-(N-acetyl-B-D-glucosaminy) asparagine amidase F in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265, 6967-6972
  30. Hayano, S., and Tanaka, A. (1967) Streptococcal sialidase. II. Kinetic and immunological studies of sialidase produced by group K streptococcus. *J. Bacteriol.* 93, 1753-1757
  31. Stamellos, K. D., Shackelford, J. E., Tanaka, R. D., and Krisans, S. K. (1992) Mevalonate kinase is located in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 267, 5560-5568
  32. de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-617
  33. Beg, Z. H., Stonik, J. A., and Brewer, H. B. Jr. (1978) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: Regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3678-3682
  34. Kabara, J. J. (1973) A critical review of brain cholesterol metabolism. *Prog. Brain Res.* 40, 363-382
  35. Sastry, P. S. (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipids Res.* 24, 69-176

36. Bjelke, B., and Seiger, A. (1989) Morphological distribution of MBP-like immunoreactivity in the brain during development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7, 145-164
37. Briggs, M. R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 14490-14496
38. Wang, X., Briggs, M. R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 268, 14497-14504
39. Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* 75, 187-197
40. Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Wang, X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11603-11607
41. Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X., and Goldstein, J. L. (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* 77, 53-62
42. Ericsson, J., Jackson, S. M., Lee, B. C., and Edwards, P. A. (1996) sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 945-950
43. Guan, G., Jiang, G., Koch, R. L., and Shechter, I. (1995) Molecular cloning and functional analysis of the promoter of the human squalene synthase gene. *J. Biol. Chem.* 270, 21958-21965
44. Yang, J., Brown, M. S., Ho, Y. K., and Goldstein, J. L. (1995) Three different rearrangements in a single intron truncate SREBP-2 and produce sterol resistant phenotype in three cell lines. *J. Biol. Chem.* 270, 12152-12161
45. Yang, J., Sato, R., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1994) Sterol-resistant transcription in CHO cells caused by gene rearrangement that truncates SREBP-2. *Genes & Dev.* 8, 1910-1919

46. Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, M. J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1994) Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J. Biol. Chem.* 269, 17267-17273
47. Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A., and Spiegelman, B. M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4753-4759
48. Hua, X., Sakai, J., Brown, M. S., and Goldstein J. L. (1996) Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 10379-10384
49. Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S., and Goldstein J. L. (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* 85, 1037-1046
50. Dehouck, B., Dehouck, M. P., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1994) Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: Intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Cell Biol.* 126, 465-473