

## 脂肪酸の酸化経路の確立

### 細胞質アルデヒドデヒドロゲナーゼの役割

宮尾夕子、山本 覚\*

脂肪酸の一部は $\omega$ -酸化経路および $\beta$ -酸化経路を経てより炭素鎖の少ないジカルボン酸に代謝される。脂肪酸 $\omega$ -酸化経路は連続する3つの反応を触媒する $\omega$ -水酸化酵素、アルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼで構成されているが、脂肪酸 $\omega$ -酸化経路の観点からアルデヒドデヒドロゲナーゼの詳細な性質については十分に解明されていない。著者らはウサギ肝の細胞質画分に $\omega$ -オキソ脂肪酸に特異性を示すアルデヒドデヒドロゲナーゼを見出している。本論文ではこのアルデヒドデヒドロゲナーゼのウサギ肝の細胞質画分精製、これをコードするcDNAのクローニングとその大腸菌内での発現について報告する。12-oxo lauric acidに特異性を示すAldDHをSDS-PAGEで分子量50 kDaの位置に単一バンドを示す標品にまで精製した。また、500アミノ酸残基からなるアミノ酸配列をもつタンパク質をコードするcDNAをウサギ肝cDNAライブラリーよりクローニングした。cDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列はヒト由来のレチナールデヒドロゲナーゼと約90%の相同性を有していた。細胞質から精製されたAldDH (AldDH-C) と大腸菌内で発現させたAldDH (AldDH-R) の酵素標品は、ともに $\omega$ -オキソ脂肪酸を基質として認識し、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を示した。抗AldDH-R抗体はウサギ肝細胞質の12-oxo lauric acidデヒドロゲナーゼ活性をAldDH-Rと同様の割合で阻害した。これらの結果は、脂肪酸 $\omega$ -酸化経路においてこのAldDHが重要な役割を果たしていることを示唆している。

キーワード：脂肪酸、 $\omega$ -酸化、アルデヒドデヒドロゲナーゼ

脂肪酸はトリアシルグリセロールとして脂肪組織に蓄積され、必要に応じて各組織に運搬されてミトコンドリアの $\beta$ -酸化経路およびTCA回路でエネルギー代謝の基質として利用される。一方、Verkadeらは食物として摂取した脂肪酸の一部が、カルボキシル基と反対側の $\omega$ 位がカルボン酸にまで酸化されることを見出し、この経路を脂肪酸 $\omega$ -酸化経路として報告した<sup>1)</sup>。脂肪酸が $\omega$ 酸化を受けて生成するジカルボン酸は、ミトコンドリアあるいはペルオキシソームの $\beta$ 酸化経路でさらに代謝され、アジピン酸やコハク酸などの短鎖ジカルボン酸にまで分解されるが、その生理的な役割は未だ明らかにされていない<sup>2)</sup>。

〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科。

\*Tel: +81-84-936-2112, Fax: +81-84-936-2023, E-mail: satoru@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

脂肪酸 $\omega$ 酸化の最初の反応は、脂肪酸 $\omega$ 水酸化酵素により触媒される脂肪酸 $\omega$ 位の水酸化である。脂肪酸 $\omega$ 水酸化酵素は、P450 遺伝子スーパーファミリーの中で CYP4 ファミリーに分類されるシトクローム P450 (P450) モノオキシゲナーゼ系で、これまでに CYP4A1 (ラット肝)<sup>3)</sup>、CYP4A5、CYP4A6、CYP4A7 (ウサギ腎)<sup>4,5)</sup>、CYP4A11 (ヒト腎)<sup>6)</sup> などが精製され、その詳細な性質が明らかにされている。これらの脂肪酸 $\omega$ 水酸化酵素は、NADPH を電子供与体として、分子状酸素の一原子酸素を脂肪酸の $\omega$ 位または( $\omega-1$ )位に添加する。一方、 $\omega$ 位に水酸基を導入された $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸の代謝酵素系については、詳しい報告は少ない。動物の肝組織のアルコールデヒドロゲナーゼ (AlcDH) やアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AldDH) には多数のアイソザイムが存在し、それらの基質特性は低く種々のアルコール性水酸基やアルデヒドに対して脱水素活性を有するため、 $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸や $\omega$ -オキソ脂肪酸は、これら AlcDH および AldDH によって代謝されると推定されているにすぎない。しかし、ウサギ小腸粘膜ミクロソーム<sup>7)</sup> およびラット肝ペルオキシソーム<sup>8)</sup> には、高級アルキルアルコールに対して高い特異性を示す AlcDH の存在が報告されている。著者らは、NAD<sup>+</sup>存在下で $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸である 12-hydroxy lauric acid をウサギ肝細胞質画分とともにインキュベートすると、1,12-dodecane dioic acid を生成することを見い出している。また、12-hydroxy lauric acid 代謝活性は熱に対して極めて不安定であるのに対して、ethanol 脱水素酵素活性は熱に対して比較的安定であった (データ未発表)。このことは $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸に特異性を示す脂肪酸 $\omega$ -酸化経路に特異的な酵素系の存在を示唆している。

著者らは、脂肪酸 $\omega$ 酸化経路を確立するため、ウサギ肝細胞質の $\omega$ -オキソ脂肪酸に特異性を示す AldDH を精製し、その基質特異性を明らかにした。また、cDNA の塩基配列よりそのタンパク質全一次構造を決定した。本論文では、同酵素の酵素化学的性質と脂肪酸 $\omega$ 酸化経路における同酵素の役割について詳述する。

## 実験方法

**ウサギ肝細胞質画分の調製** ウサギ (日本白色種、オス) を屠殺後、肝臓を摘出した。肝臓を 1.15%塩化カリウム溶液で灌流して細切した後、組織重量の 5 倍量のミクロソーム調製用緩衝液 (0.25 M Sucrose, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.5) に懸濁した。この組織懸濁液を氷冷下でホモジネートした。これを遠心分離 (10,000 x g, 20min, 4°C) し、その上清を再度遠心分離 (78,000 x g, 60 min, 4°C) して得られた上清を細胞質画分とし、AldDH 精製の粗酵素試料とした。

**$\omega$ -オキソ脂肪酸の調製法** AldDH の基質となる種々の $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸を pyridinium chlorochromate を用いて部分酸化し、 $\omega$ -オキソ脂肪酸を合成した<sup>(9)</sup>。反応生成物を薄層クロマトグラフィーにより分離して、 $\omega$ -オキソ脂肪酸の Rf 値部分のシリカゲルを回収し、 $\omega$ -オキソ脂肪酸を Folch 法で抽出した。調製した試料の純度および濃度は HPLC およびガスクロマトグラフィーで検定した。

**アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の測定法** AldDH 活性は、生成物を HPLC で分離定量した。酵素反応液 1 ml (基質; 100 nmol、Tris-HCl, pH 7.0; 100  $\mu$  mol、NAD<sup>+</sup>; 500 nmol、酵素液) を 37°C で 10 分間インキュベートし、反応終了後、1N HCl を 0.2ml 添加して反応を停止した。反応液中の未反応基質と反応生成物を 3 ml の酢酸エチルで抽出したのち、窒素気流下で酢酸エチルを除去した。これに phenacyl bromide (1.2  $\mu$  mol) およ

## 脂肪酸 $\omega$ 酸化経路の確立

び triethylamine (2.0  $\mu$  mol) を添加して 50 °C で 120 分間インキュベートし、基質および生成物のカルボキシル基をフェナシル化し HPLC で分離定量した。HPLC 分析には、ODS-120T カラム (4.6 x 250 mm) (東ソー(株)) を用い、溶出液 (acetonitrile : H<sub>2</sub>O = 70:30) を流速 1 ml/min で流し、アイソクラテックモードで溶出した。検出には 254 nm の吸光度を利用した。また、定量には 1,12-dodecane dioic acid フェナシル誘導体を標準品に用いて検量線を作成した。

また、K<sub>m</sub> および V<sub>max</sub> を求める実験では、AldDH 活性を、反応に共役して生成する NADH の 338 nm の吸光度の増加を測定し、NADH のモル分子吸光係数を 6,220 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> として求めた。

**ウサギ肝細胞質アルデヒドデヒドロゲナーゼ (AldDH-C) の精製** 粗酵素液 (ウサギ肝細胞質画分) を硫酸アンモニウムを用いて分画塩析した。50%-70%飽和沈澱画分を緩衝液 A (20% glycerol および 1 mM DTT を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.5) に溶解した後、緩衝液 A に対して透析脱塩した。これを緩衝液 A で平衡化した DEAE-cellulose カラム (φ 2.5 x 20 cm) に負荷した。カラムを緩衝液 A で洗浄し、素通りする画分を分画し、12-hydroxy lauric acid を基質に用いて脱水素酵素活性を有する画分を回収した。この素通り活性画分を緩衝液 A で平衡化した CM-cellulose カラム (φ 2.5 x 20 cm) に負荷した。カラムを緩衝液 A で洗浄し、カラムを素通りする画分を分画し、同酵素活性を示す画分を回収した。CM-cellulose 素通り活性画分を緩衝液 A で平衡化した 5'-AMP sepharose カラム (φ 1.0 x 10 cm) に負荷した。同カラムを緩衝液 A で洗浄後、0.5 mM NAD<sup>+</sup> を含む緩衝液 A を用いてアルデヒドデヒドロゲナーゼを溶出した。この溶出液を緩衝液 A に対して透析したものを最終精製標品とした。

**cDNA のクローニングと大腸菌内発現** 精製したアルデヒドデヒドロゲナーゼを CNBr で限定分解して生じたペプチド断片について、アミノ酸配列を決定した。この配列をもとにリジェネートプライマーを作製し、ウサギ肝 mRNA をテンプレートに用いて RT-PCR 法にて cDNA 断片を増幅した。この cDNA 断片をプローブとしてウサギ肝 cDNA ライブラリー ( $\lambda$ gt11) より cDNA をスクリーニングした。クローニングした cDNA の塩基配列はオートシーケンサー (ABI 310) を用いて決定した。アルデヒドデヒドロゲナーゼ cDNA を大腸菌内で発現させるため、同 cDNA の ORF 領域 1,500 bp を pET16b のクローニングサイトに挿入した pET-Ald を構築した。pET-Ald で大腸菌 BL21 株を形質転換し、この形質転換体を、0.5 mM IPTG を含む LB 培地中で、15°C で一晩振盪培養した。この培養菌体を集菌して 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に懸濁した後、Triton-X および lysozyme をそれぞれ 0.03% Triton-X および 0.1mg/ml となるように加え、凍結融解にて菌体破砕した。菌体破砕抽出液を超遠心分離 (78,000 x g, 60min, 4°C) し、その遠心上清を可溶性画分として回収した。この遠心上清からの発現タンパク質の精製は、ウサギ肝細胞質画分からの精製と同様に、DEAE-cellulose および 5'-AMP sepharose を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

**抗 AldDH 抗体の調製と精製** 精製した発現タンパク質を用いて抗 AldDH-R モルモット抗体を作製した。モルモット血清からの IgG の精製には Hi Trap<sup>TM</sup> Protein A HP を用いた。精製発現タンパク質およびウサギ肝細胞質を抗 FA-Ald-DH モルモット抗体とともに 37°C で 10 分間プレインキュベートし、12-oxo lauric acid に対するアルデヒド脱水素活性を測定した。対照実験には同量の非免疫モルモット IgG を用いた。

結果および考察

ウサギ肝細胞質画分の脂肪酸 $\omega$ -酸化経路に関わるデヒドロゲナーゼ活性

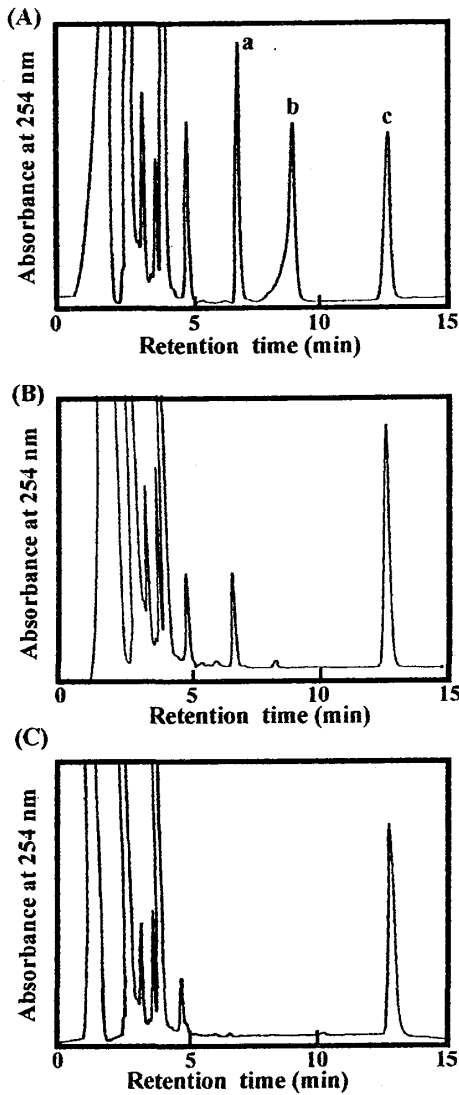


Fig. 1 ウサギ肝細胞質による $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸および $\omega$ -オキシ脂肪酸代謝生成物の同定

(A) 標準品のフェナシル誘導体の HPLC 溶出パターン a; 12-hydroxy lauric acid, b; 12-oxo lauric acid c; 1,12-dodecandioic acid. (B) 12-hydroxy lauric acid, および (C) 12-oxo lauric acid を基質として NAD<sup>+</sup>存在下でウサギ肝細胞質と共に、37°Cで 30 分間インキュベートして生じたそれぞれの反応生成物フェナシル誘導体の HPLC 溶出パターン。

ミクロソームの脂肪酸 $\omega$ -水酸化酵素の働きにより生成する $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸、および $\omega$ -オキシ脂肪酸の代謝活性を検討した。ウサギ肝細胞質画分を酵素試料として、12-hydroxy lauric acid、および 12-oxo lauric acid を基質に用いて、NAD<sup>+</sup>存在下、37°Cで 30 分間酵素反応を行い、その反応生成物を HPLC で分析した (Fig. 1)。12-hydroxy lauric acid を基質とした場合、顕著な 1,12-dodecane dioic acid の生成が認められ、また、わずかながら 12-oxo lauric acid の生成が認められた (Fig. 1-B)。一方、12-oxo lauric acid を基質とした場合、30 分間のインキュベートにより基質全量が 1,12-dodecane dioic acid に変換されていた (Fig. 1-C)。この肝細胞質の 12-hydroxy lauric acid デヒドロゲナーゼ活性は、Fig. 2 に示すようにタンパク質依存性および反応時間依存性を示した。これらの結果より、肝細胞質画分には、脂肪酸 $\omega$ -酸化経路に関与するアルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼが存在することが示された。

ウサギ肝細胞質からのアルデヒドデヒドロゲナーゼの精製とその基質特異性

肝細胞質の硫酸塩析物について DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを行い、その溶出画分について 12-oxo lauric acid および Acetaldehyde を基質に用いてアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、同カラムを素通りする画分に 12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性が存在した。この素通り画分を CM-cellulose

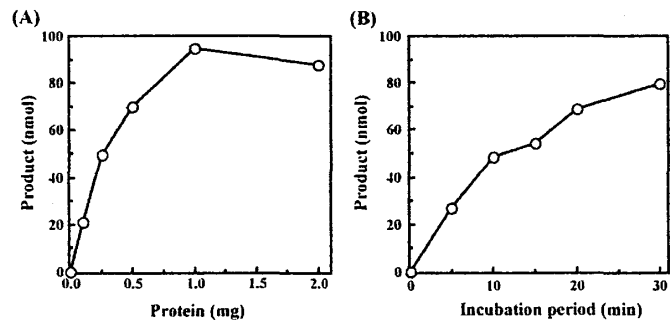


Fig. 2 ウサギ肝細胞質の 12-hydroxy lauric acid 代謝活性のタンパク質および反応時間依存性

脂肪酸の酸化経路の確立

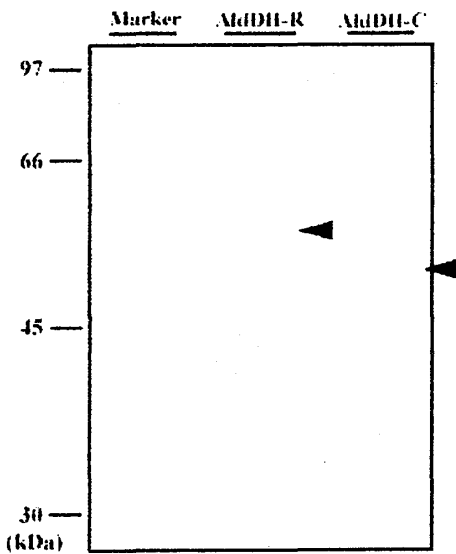


Fig. 3 精製した AldDH-C および AldDH-R の SDS-PAGE

Table I AldDH-C および AldDH-R の種々のアルデヒドに対する Km および Vmax

Substrate	AldDH-R		AldDH-C	
	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg)	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg)
16-Oxo Palmitic acid	38	596	28	784
12-Oxo Lauric acid	48	851	18	701
10-Oxo Capric acid	28	951	8	404
8-Oxo Caprylic acid	17	429	9	425
Dodecylaldehyde	488	1,010	391	874
Undecenylaldehyde	322	824	125	489
Decylaldehyde	188	792	78	623
Nonylaldehyde	154	733	44	487
Octylaldehyde	113	657	31	568
Heptylaldehyde	125	796	27	614
Hexylaldehyde	91	614	27	480
Valeraldehyde	45	398	13	431
Butyraldehyde	54	322	25	387
Propionaldehyde	165	339	34	314
Acetaldehyde	2,740	380	3,920	290

ORF の 5'側に、開始コドン ATG は存在しなかったが、ヒト肝のアルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 で報告されている一次構造<sup>10)</sup>と比較した結果、開始コドンのコードするメチオニンのみが欠失していると推定され、成熟タンパク質の全長がコードされていることが判明した。なお、精製された AldDH の N-末端はブロックされており、決定できなかった。推定される一次構造には、アルデヒドデヒドロゲナーゼの活性中心を形成するアミノ酸配列 (VTLELG GK)、および (FYHQGCCIAA) が高度に保存されていた。この配列についてデータベースで検索した結果、Table II に示すように、種々のヒト起源のアルデヒドデヒドロゲナーゼと有意な相同性を有することが明らかになり、その中でも、レチナルデヒドロゲナーゼ 1 と最も高い相同性(90%)を有していた。これらの結果から、本 cDNA がコードするタンパク質はレチナルデヒドロゲナーゼであることが示唆された。

カラムに負荷した。12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性は CM-cellulose カラム素通り画分に存在した。この CM-cellulose 素通り画分について 5'-AMP Sepharose カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。この 5'-AMP Sepharose カラム溶出画分は SDS-PAGE で単一バンドを示し、その分子量は約 50 kDa と推定された (Fig. 3)。この精製標品を AldDH-C (C は cytosol の意) とした。

AldDH-C の基質特異性を検討するために、種々のアルデヒドに対する Km および Vmax を求めた (Table I)。AldDH-C の ω-オキシ脂肪酸である 16-oxo palmitic acid、12-oxo lauric acid、10-oxo capric acid、および 8-oxo caprylic acid に対する Km 値は、それぞれ 28 μM、18 μM、8 μM、および 9 μM と極めて低い値を示した。一方、acetaldehyde に対する Km 値は 3.92 mM と高く、また、炭素数 3~12 のアルキルアルデヒドに対する Km 値は同じ炭素数の ω-オキシ脂肪酸と比べて高い値であった。脂肪酸の ω-オキシ体に対する Km 値は、ω-オキシ脂肪酸の生理的濃度とも一致しており、ω-オキシ脂肪酸が本酵素の生理的基質であることを強く示唆している。

アルデヒドデヒドロゲナーゼの cDNA クローニングと推定されるタンパク質一次構造

ウサギ肝 cDNA ライブラリーより AldDH-C の cDNA をクローニングした。AldDH-C cDNA の全長は 2,133bp で 500 残基のアミノ酸配列をコードする 1,500 bp の open reading frame (ORF) と 610 bp の 3'-非翻訳領域が存在した (Fig. 4)。

1 attcAGGTTTCTGCTGAGCCTGTACCTGTGTTCTGGGAGCCGAACCAGGAAAATCGTCTCAGGCATGGCAGACTTACCTACCCCACCTC  
 1 S S S G M A D L P T P L  
 91 ACCAATTTGAAGATTCAATATACCAAGATCTTCATAAACAATGAGTGGCATGATTGAGTGGCAGCGCAAGAAATTCCTGTCTTAATCCT  
 13 T N L K I Q Y T K I F I N N E W H D S V S G K K F P V L N P  
 181 GCCACTGAGGAGCAAATATGCCTGATTGAAGAAGGAGATAAGGCAGATGTTGACAAGGCTGTGAAGGCAGCAAGGCAGGCTTTTCAGATT  
 43 A T E E Q I C L I E E G D K A D V D K A V K A A R Q A F Q I  
 271 GGCTCTCCATGGCGTACTATGGATGCTTCCCAGAGGGGACGACTACTACAGTTGGCTGACTTAATTGAAAGAGATCGCCTGTCTGCTG  
 73 G S P W R T M D A S Q R G R L L Y K L A D L I E R D R L L L  
 361 GCAACTATGGAGTCACTGAATGCTGGAAAACCTGTTCCCAATGCATATCTGATGGATTAGGAGGTTGCATAAAAAACCTACGCTACTGT  
 103 A T M E S L N A G K L F P N A Y L M D L G G C I K T L R Y C  
 451 GCAGTTGGGCTGACAAGATCCAGGGCCGCACAATGCCGATGGATGGAGACTTTTTTTGTTACACAAGACCTGAACCTGTTGGTGTATGT  
 133 A G W A D K I Q G R T M P M D G D F F C Y T R P E P V G V C  
 541 GGCCAAATCATTCTTGGAAATTTCCCGTTGGTTATGCTCATTGGAAGATAGGGCCCTGCCCTGAGCTGGAAACACTGTGATCGTGGAA  
 163 G Q I I P W N F P L V M L I W K I G P A L S C G N T V I V K  
 631 CCTGCTGAACAACTCCCTCCTGCTCTTCATGTTGGCGTCTTTAATAAAGAGGCAGGTTTTCTCCTGGCGTGTGAACATTGTCCT  
 193 P A E Q T P L T A L H V A S L I K E A G F P P G V V N I V P  
 721 GGTATGGGCGACTGCAGGGGCGAGCCATTTCTCCACATGGACATAGACCAAGTTGCCTTCACAGGATCAACAGAGTTGGCAAATG  
 223 G Y G P T A G A A I S S H M D I D Q V A F T G S T E L A K L  
 811 ATCAAAGAAGCTGCTGGGAAAAGCAACCTGAAGAGGGTGACCTGGAGCTCGGGGGAAAGGCCCTGCATTGTGTTTCCCGATGCTGAC  
 253 I K E A A G K S N L K R V T L E L G G K S P C I V F A D A D  
 901 TTGGACAATGCCGTTGAGTTTGCACACCAAGGGGTGTTCTACCATCAGGGCCAGTGTTCATAGCTGCATCCAGGCTTTTTGTGGAGGAA  
 283 L D N A V E F A H Q G V F Y H Q G Q C C I A A S R L F V E E  
 991 TCCATTTACGATGAGTTTGTTCGAAGGAGTGTTCGAGCGGCAAGAGATGTTCTTGGAAATCCTCTGGCCCCAGAGTAAACCAAGGC  
 313 S I Y D E F V R R S V E R A K K Y V L G N P L A P E V N Q G  
 1,081 CCTCAGATTGACAAAGAACAATATAATAAAATACTTGACCTCATTGAGAGTGGGAAGAAGCAATGGGCCAAACTGGAATGTGGTGGAGGC  
 343 P Q I D K E Q Y N K I L D L I E S G K K Q W A K L E C G G G  
 1,171 CCATGGGGGAATAAAGCTATTTTATCCAGCCACAGTTTTCTCCAATGTGACAGATGAGATGCGCATTGCCAAAGAGCAGATATTTGGA  
 373 P W G N K G Y F I Q P T V F S N V T D E M R I A K E Q I F G  
 1,261 CCAGTGCAGCAAATCATGAAGTTTAAATCTCTAGATGATGTGATCAAGAGAGCAAATAACACTACATATGGCTTATCAGCAGGAATCTTT  
 403 P V Q Q I M K F K S L D D V I K R A N N T Y G L S A G I F  
 1,351 ACCAAAGACCTCGATAAAGCCGTAACAGTGTCTCGGCTCTGCAGGCGGGAACAGTGTGGGTGAATTGTCTACAGCGTGTCTGCCCCAG  
 433 T K D L D K A V T V S S A L Q A G T V W V N C Y S V V S A Q  
 1,441 GTCCCTTTTGGTGGATTCAAGATGTCTGAAATGGACGAGAACTGGGAGAATATGGTCTCCAACAATATACAGAGGTCAAGACAGTCA  
 463 V P F G G F K M S G N G R E L G E Y G L Q Q Y T E V K T V T  
 1,531 GTGAAAATCTCACAGAAGAACTCGTAAaggaacttctgagagagacgacactgcaatggctacgcatcagcagcagtcacaaatagaatg  
 593 V K I S Q K N S \* 500  
 1,621 tgttttagacctcaactgtttctgtgattttcttttagcataaactaatcacattagtagtattactgtcacacattaaagtcttgacag  
 1,711 gcagcttatttggaagaactgtttgctccctgctatgtgacccccaggtccttaggctaaatagaagcacagatttagatacaagctctc  
 1,801 tgtagctctgtcctagccatgtgctttttttttttttttctgtgactactatttcaggaaaatcactttatagaagagaaccagtagtc  
 1,891 atttagcctttttcccttaaggactccttcaagggttaacatagacgataaactgcagagcacggttctgtctgttcccaggaggttaggaag  
 1,981 tcctcagtgccctgagatagttcctagaatgccctgtctgctgtgcaatgagtaatgcctgcagtagctcagctgtaactgtaatagaa

Fig. 4 ウサギ肝細胞質のアルデヒドデヒドロゲナーゼ cDNA の全塩基配列および推定されるアミノ酸配列 AldDH-C を CNBr 分解して得られたペプチドから決定したアミノ酸配列を一重下線で、ポリアダニレーションシグナルを二重下線で示した。アルデヒドデヒドロゲナーゼの活性中心を形成する領域を口で示した。

Aldehyde dehydrogenase (Human)	Identity (%)	Reference
Retinal dehydrogenase 1	90.0	(10)
Retinal dehydrogenase 2	71.7	(11)
Retinal dehydrogenase 3 (Aldehyde dehydrogenase 6)	69.3	(11)
Aldehyde dehydrogenase I	67.4	(12)
Aldehyde dehydrogenase (Class II)	64.7	(13)
Aldehyde dehydrogenase III	27.6	(14)
Aldehyde dehydrogenase 7	24.4	(15)
Aldehyde dehydrogenase 8	26.8	(16)
Aldehyde dehydrogenase 9	39.6	(17)
Aldehyde dehydrogenase 10	26.3	(18)

Table II ウサギ肝細胞質アルデヒドデヒドロゲナーゼと種々のヒトのアルデヒドゲナーゼとの一次構造の相同性

## 脂肪酸 $\omega$ 酸化経路の確立

### アルデヒドデヒドロゲナーゼ cDNA の発現と発現タンパク質の基質特異性

cDNA の ORF 領域 1,500 bp を pET-16b の lac プロモーターの下流のクローニングサイト (*Xho*I-*Bam*HI) に挿入して、発現ベクター pET-Ald を構築した。大腸菌 BL21 を形質転換し、pET-Ald の大腸菌内発現を試みた。この形質転換体を IPTG 存在下で培養して得られた菌体の lysate を遠心分離し、可溶性画分に存在する発現タンパク質を DEAE-cellulose カラムおよび 5'-AMP Sepharose カラムで精製した。この精製標品について SDS-PAGE を行ったところ 55 KDa の位置に単一バンドが検出された (Fig. 3)。この精製標品を AldDH-R (R は recombinant の意) とした。AldDH-R の見かけの分子量が AldDH-C より大きいのは AldDH-R が His-tag 融合タンパク質であるからと推定される。

AldDH-R の種々のアルデヒドに対する基質特異性を検討するために、種々のアルデヒドに対する  $K_m$  および  $V_{max}$  を求めた (Table I)。AldDH-R の  $\omega$ -オキソ脂肪酸である 16-oxo palmitic acid、12-oxo lauric acid、10-oxo capric acid、および 8-oxo caprylic acid に対する  $K_m$  値は、それぞれ 38  $\mu$ M、48  $\mu$ M、28  $\mu$ M、および 17  $\mu$ M と極めて低い値を示し、acetaldehyde に対する  $K_m$  値は 3.92 mM と高く、また、炭素数 3~12 のアルキルアルデヒドに対する  $K_m$  値は同じ炭素数の  $\omega$ -オキソ脂肪酸と比べて高い値であった。この基質アルデヒドの炭素数と  $K_m$  値の傾向は AldDH-C の傾向とよく一致した。AldDH-R がレチナルデヒドロゲナーゼ

に分類されることが示されたが、本研究では AldDH-R の retinal に対する触媒活性は検討していない。

### 抗 AldDH-R 抗体によるウサギ肝細胞質の 12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性の阻害

抗 AldDH-R IgG (モルモット) を用いて、AldDH-R およびウサギ肝細胞質の 12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性に対する阻害を検討した。Fig. 5 に示すように、抗 AldDH-R IgG の添加量の増加に伴って、ウサギ肝細胞質および AldDH-R の 12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性は同程度に減少し、0.5 mg の抗 AldDH-R IgG 添加で約 30% の活性が阻害された。抗 AldDH-R IgG 添加量をそれ以上に増やしても、阻害率は変化しなかった。これは、用いた IgG がモルモットで作成されたものであるため、活性中心を認識しにくいためと考えられる。

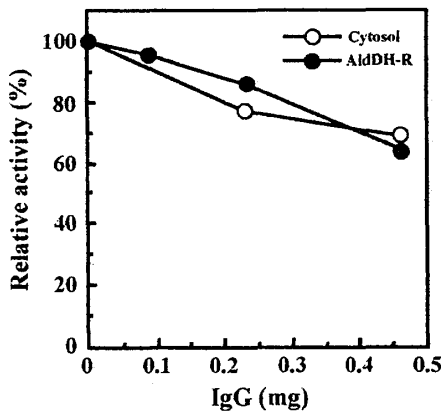


Fig. 5 抗 AldDH-R 抗体によるウサギ肝細胞質および AldDH-R の 12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性の阻害

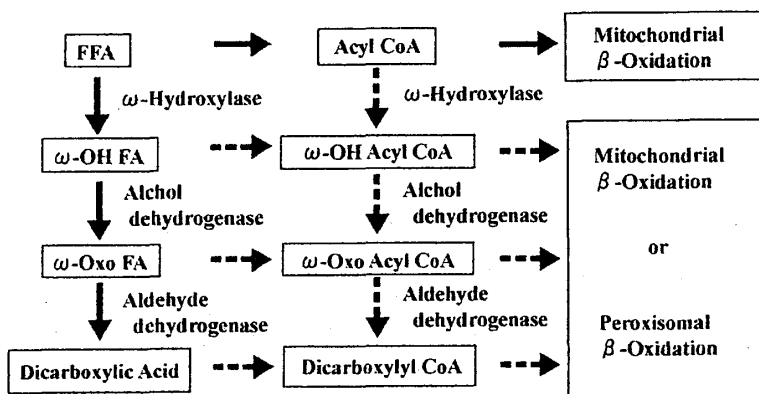


Fig. 6 脂肪酸 $\omega$ 酸化生成物の $\beta$ 酸化代謝経路

これまでに確認されている経路を実線矢印で、推定される経路を破線矢印で示す。FFA; 遊離脂肪酸、 $\omega$ -OH FA;  $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸、 $\omega$ -oxo FA;  $\omega$ -オキソ脂肪酸

しかし、肝細胞質の活性が AldDH-R と同じ程度に阻害されることから、細胞質の 12-oxo lauric acid デヒドロゲナーゼ活性は AldDH-C の働きによるものと推定された。

#### おわりに

脂肪酸 $\omega$ 酸化経路の最初の反応を触媒する脂肪酸 $\omega$ -水酸化酵素については、詳細な研究がなされているが、その後の反応を触媒する $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸デヒドロゲナーゼ、 $\omega$ -オキソ脂肪酸デヒドロゲナーゼについては、脂肪酸 $\omega$ 酸化の観点からの研究は少ない。本研究において、 $\omega$ -オキソ脂肪酸デヒドロゲナーゼの詳細を解明した。 $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸デヒドロゲナーゼについて検討する予定である。一方、脂肪酸は $\omega$ -酸化と $\beta$ -酸化を受けて炭素鎖長の短いジカルボン酸に代謝されるが、 $\beta$ -酸化を受けるために、脂肪酸 $\omega$ -酸化経路のどの時点でアシル CoA シンターゼが働いて Acyl-CoA に変換されるのかは十分には明らかにされていない (Fig. 6)。Vamecq らは、ジカルボン酸のアシル CoA シンターゼがミクロソームに存在することを報告しているが<sup>19)</sup>、著者らはミトコンドリアのアシル CoA シンターゼが $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸、 $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸、およびジカルボン酸を基質とすることを見出している (未発表データ)。今後は脂肪酸 $\omega$ -酸化経路を確立するため、これらの点を解明する予定である。

#### 文献

- 1) Verkade, P. E., and van der Lee, J., Research on fat metabolism. II. *Biochem. J.*, **28**, 31-40 (1934)
- 2) Osmundsen, H., Bremer, J., and Pedersen, I. J., Metabolic aspects of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1085**, 141-158 (1991)
- 3) Yoshimoto, M., Kusunose, E., Yamamoto, S., Maekawa, M., and Kusunose, M., Purification and characterization of two forms of cytochrome P-450 from rat kidney cortex microsomes. *Biochem. Internatl.*, **13**, 749-755 (1986)
- 4) Ogita, K., Kusunose, E., Yamamoto, S., Ichihara, K., and Kusunose, M., Multiple forms of cytochrome P-450 from kidney cortex microsomes of rabbits treated with phenobarbital. *Biochem. Internatl.*, **6**, 191-198 (1983)
- 5) Yamamoto, S., Kusunose, E., Kaku, M., Ichihara, K. and Kusunose, M., Effect of peroxysomal proliferators on microsomal prostaglandin A1  $\omega$ -hydroxylase. *J. Biochem.*, **100**, 1449-1455 (1986)
- 6) Kawashima, H., Kusunose, E., Kikuta, Y., Kinoshita, H., Tanaka, S., Yamamoto, S., Kishimoto, T., and Kusunose, M., Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid  $\omega$ -hydroxylase. *J. Biochem.*, **116**, 74-81 (1994)
- 7) Ichihara, K., Kasaoka, I., Kusunose, E. and Kusunose, M., Reconstitution of aryl hydrocarbon hydroxylase from rabbit intestinal mucosa microsomes. *J. Biochem.*, **87**, 671-694 (1980)
- 8) Sakuraba, H. and Noguchi, T., Alcohol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase is present in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.*,



## 脂肪酸の酸化経路の確立

270, 37-40 (1995)

- 9) Corey, E. J. and Suggs, J. W., Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.*, 16, 2647-2650 (1975)
- 10) Hempel, J., Bahr-Lindstrom, H., and Ornvall, H. J., Aldehyde dehydrogenase from human liver. *Eur. J. Biochem.*, 141, 21-35 (1984)
- 11) Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H. and Derge, J.G., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 16899-16903 (2002)
- 12) Braun, T., Bober, E. and Singh, S., Agarwal, D. P. and Goedde, H. W., Isolation and sequence analysis of a full length cDNA clone coding for human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Nucleic Acids Res.*, 15(7), 3179 (1987)
- 13) Hsu, L. C. and Chang, W. C., Cloning and characterization of a new functional human aldehyde dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.*, 266, 12257 – 12265 (1991)
- 14) Hsu, L. C., Chang, W. C., Shibuya, A. and Yoshida, A., Human stomach aldehyde dehydrogenase cDNA and genomic cloning, primary structure, and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 267: 3030 – 3037(1992)
- 15) Hsu, L. C., Chang, W. C. and Yoshida, A., Cloning of a cDNA encoding human ALDH7, a new member of the aldehyde dehydrogenase family. *Gene*, 151, 285-9 (1994)
- 16) Hsu, L. C. and Chang, W. C., Sequencing and expression of the human ALDH8 encoding a new member of the aldehyde dehydrogenase family. *Gene*, 174, 319-22 (1996)
- 17) Kikonyogo, A. R. and Pietruszko, R., Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates  $\gamma$ -aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates.  $\gamma$ -aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution. *Biochem. J.*, 316, 317–324 (1996)
- 18) Chang, C. and Yoshida, A., Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10): organization and tissue-dependent expression. *Genomics*, 1997, 40(1), 80-5, (1997)
- 19) Vamecq, J., Hoffmann, E. D. E. and Van Hoof F., The microsomal dicarboxyl-CoA synthetase. *Biochem. J.*, 230, 683-693 (1985)

\*\*\*\*\*

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (5), 1-10 (2006)

## A Role of Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase in Fatty Acid $\omega$ -Oxidation Pathway

Yuko Miyao, and Satoru Yamamoto

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University,  
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

A part of fatty acids are metabolized to the shorter chain dicarboxylic acids *via*  $\omega$ -oxidation and  $\beta$ -oxidation pathway.  $\omega$ -Oxidation pathway is composed of three sequential steps catalyzed by  $\omega$ -hydroxylase, alcohol dehydrogenase (AlcDH) and aldehyde dehydrogenase (AldDH), respectively. However, AldDH is not studied well in a view of  $\omega$ -oxidation pathway. We found a novel AldDH specific for  $\omega$ -oxo fatty acids in rabbit liver cytosolic fraction. This paper describes the purification of AldDH from rabbit cytosolic fraction, the cloning of a cDNA encoding the AldDH and its expression in *E. coli*.

An AldDH specific for 12-oxo lauric acid was purified to a single band, which showed an apparent molecular weight of 50 kDa on SDS-PAGE. A cDNA (2.1 kbp) encoded a protein of 500 amino acids has been isolated from rabbit liver cDNA library. The amino acid sequence predicted from the cDNA showed 90% identity with that of human retinal dehydrogenase. Purified AldDH (AldDH-C) and AldDH expressed in *E. coli* (AldDH-R) recognize as substrates 16-oxo palmitic acid, 12-oxo lauric acid, 10-oxo capric acid, and 8-oxo caprylic acid. 12-oxo lauric acid dehydrogenase activity in rabbit liver cytosolic fraction was inhibited by an antibody against AldDH-R with a same manner of AlcDH-R. These results indicate that this AldDH is an essential enzyme in fatty acid  $\omega$ -oxidation pathway.

**Key words: fatty acid,  $\omega$ -oxidation, aldehyde dehydrogenase**